

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

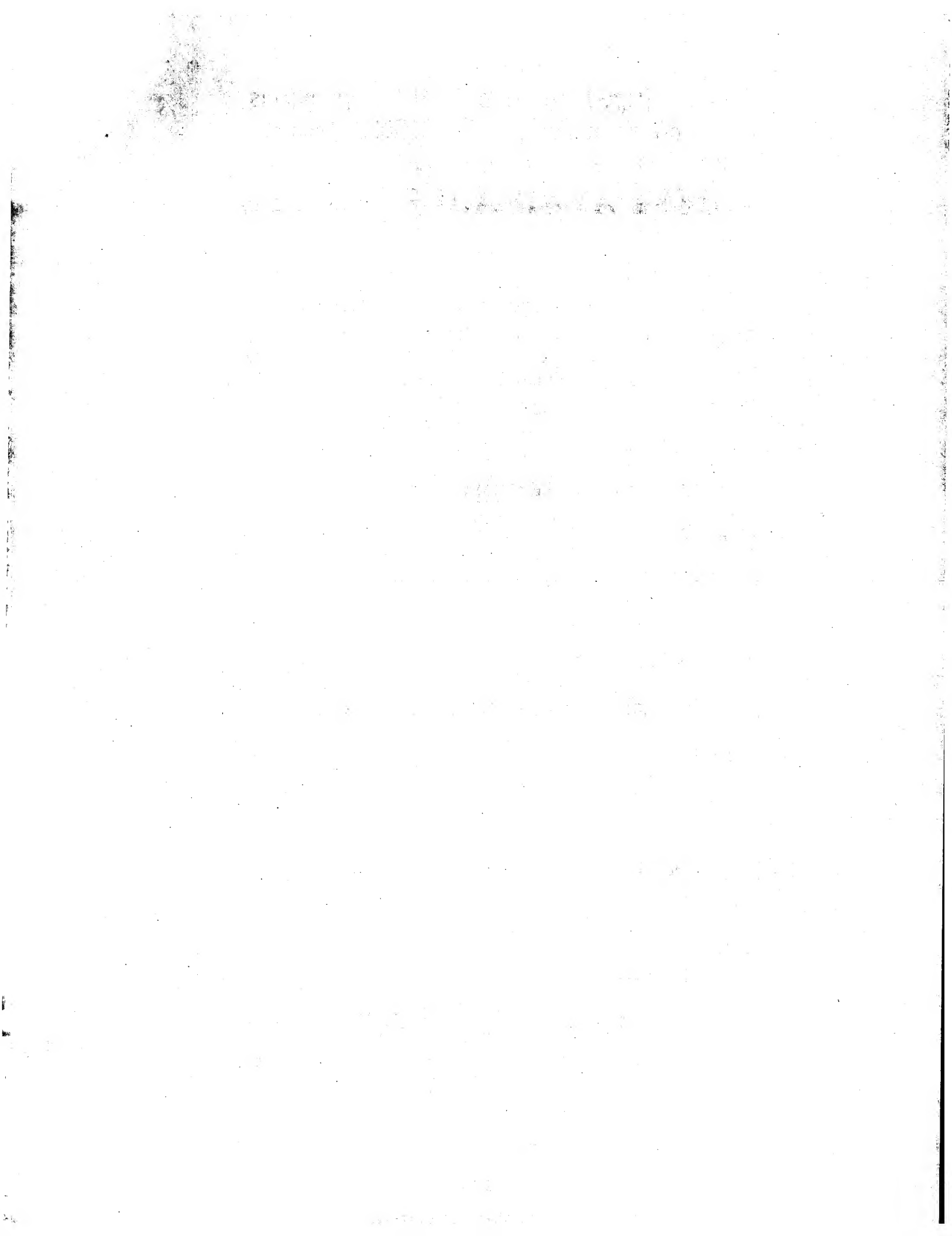
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**





D1

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|---|----|---|
| <p>(51) Classification internationale des brevets⁵ : C12N 15/57, C12P 21/02 C07K 7/10, C12N 9/48 C12Q 1/68, G01N 33/68 C12Q 1/37, A61K 37/02 C12P 21/08</p> | A2 | <p>(11) Numéro de publication internationale: WO 90/03435</p> <p>(43) Date de publication internationale: 5 avril 1990 (05.04.90)</p> |
| <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR89/00496</p> <p>(22) Date de dépôt international: 27 septembre 1989 (27.09.89)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 88/12620 27 septembre 1988 (27.09.88) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : SOUBRIER, Florent [FR/FR]; 11, square Henry-Paté, F-75016 Paris (FR). ALHENC-GELAS, François [FR/FR]; 23, rue Rosenwald, F-75015 Paris (FR). HUBERT, Christine [FR/FR]; Parc Eiffel 32, Rue des Bruyères, F-92310 Sèvres (FR). CORVOL, Pierre [FR/FR]; 88, rue de Sèvres, F-75007 Paris (FR).</p> | | <p>(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc. ; S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud, 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p> |
| <p>(54) Title: NUCLEIC ACID CODING FOR THE HUMAN ANGIOTENSIN CONVERSION ENZYME (ACE), AND ITS APPLICATIONS PARTICULARLY FOR THE <i>IN VITRO</i> DIAGNOSIS OF HIGH BLOOD PRESSURE</p> <p>(54) Titre: ACIDE NUCLEIQUE CODANT POUR L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE (ECA) HUMAINE, ET SES APPLICATIONS, NOTAMMENT POUR LE DIAGNOSTIC <i>IN VITRO</i> DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to the cloning and sequencing of nucleic acid coding for human ACE as well as to the determination of the peptidic chain corresponding to ACE and active peptidic fragments derived therefrom. The invention also relates to the utilization of the above-mentioned polypeptides for implementing methods for <i>in vitro</i> diagnosis of high blood pressure, for the conceptual study of new inhibitors of ACE. The invention also relates to the use of nucleotidic probes of the invention for the <i>in vitro</i> detection of polymorphisms of the gene coding for ACE.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne le clonage et le séquençage de l'acide nucléique codant pour l'ECA humaine ainsi que le détermination de la chaîne peptidique correspondant à l'ECA et de fragments peptidiques actifs qui en découlent. L'invention a également pour objet l'utilisation des polypeptides sus-mentionnés pour la mise en œuvre de méthodes de diagnostic <i>in vitro</i> de l'hypertension, pour l'étude conceptuelle de nouveaux inhibiteurs de l'ECA. L'invention concerne également l'utilisation des sondes nucléotidiques de l'invention pour le dépistage <i>in vitro</i> des polymorphismes du gène codant pour l'ECA.</p> | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|-----------------------------------|----|---|----|-----------------------|
| AT | Autriche | ES | Espagne | MG | Madagascar |
| AU | Australie | FI | Finlande | ML | Mali |
| BB | Barbade | FR | France | MR | Mauritanie |
| BE | Belgique | GA | Gabon | MW | Malawi |
| BF | Burkina Faso | GB | Royaume-Uni | NL | Pays-Bas |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BJ | Bénin | IT | Italie | RO | Roumanie |
| BR | Brsil | JP | Japon | SD | Soudan |
| CA | Canada | KP | République populaire démocratique de Corée | SE | Suède |
| CF | République Centrafricaine | KR | République de Corée | SN | Sénégal |
| CG | Congo | LI | Liechtenstein | SU | Union soviétique |
| CH | Suisse | LK | Sri Lanka | TD | Tchad |
| CM | Cameroun | LU | Luxembourg | TG | Togo |
| DE | Allemagne, République fédérale d' | MC | Monaco | US | Etats-Unis d'Amérique |
| DK | Danemark | | | | |

ACIDE NUCLEIQUE CODANT POUR L'ENZYME DE CONVERSION
DE L'ANGIOTENSINE (ECA) HUMAINE, ET SES
5 APPLICATIONS, NOTAMMENT POUR LE DIAGNOSTIC IN VITRO
DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE.

L'invention concerne un acide nucléique codant
pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)
humaine ainsi que des vecteurs contenant cet acide
10 nucléique et l'utilisation de ces derniers pour la
production d'ECA humaine. L'invention concerne
également les applications de cet acide nucléique,
notamment dans le domaine de la conception de nouveaux
inhibiteurs de l'ECA humaine.

15 L'ECA, ou peptidyl dipeptidase A (EC 3.4.15.1), ou
encore kininase II, joue un rôle important dans la
régulation de la pression artérielle, en hydrolysant
l'angiotensine I (peptide inactif libéré après clivage
de l'angiotensinogène par la rénine) en angiotensine II
20 vasopressive jouant un rôle dans les mécanismes de
l'hypertension artérielle (SKEGGS, L.T., et al (1986)
J. Exp. Med., 103, 295-299).

L'inhibition de l'activité de l'ECA par l'EDTA et
les chélateurs de métaux, indique qu'il s'agit d'une
25 métallopeptidase, plus particulièrement d'une peptidase
à zinc, capable d'hydrolyser, non seulement,
l'angiotensine I, mais aussi la bradykinine (un peptide
vasodilateur et natriurétique qu'elle transforme en un
heptapeptide inactif), et de nombreux autres peptides à
30 activité biologique (YANG, H.Y.T. et al (1970)
Biochim. Biophys. Acta, 214, 374-376 ; ERDOS, E.G., et
al (1987) Lab. Invest., 56, 345-348).

L'ECA est une peptidase largement distribuée dans
l'organisme, que l'on retrouve par exemple sous forme
35 d'enzyme membranaire à la surface des cellules

endothéliales vasculaires, et des cellules épithéliales
rénales, ainsi que sous forme d'enzyme circulant dans
le plasma (ERDOS, et al (1987) sus-mentionné ;
5 CARDWELL, P.R.B. et al, (1976) Science, 191, 1050-1051
; RYAN, U.S. et al (1976) Tissue Cell, 8, 125-145).

Des méthodes de purification de l'ECA humaine ou
animale ont déjà été décrites (notamment dans BULL H.G.
et al, (1985) J. Biol. Chem., 260, 2963-2972 ; HOOPER,
10 N.M. et al, (1987) Biochem. J., 247, 85-93).

Toutefois, la structure de l'ECA humaine n'est
pas connue à l'heure actuelle. Seules quelques
séquences peptidiques de l'ECA d'origine animale ont
été publiées (BERNSTEIN, K.E. et al (1988), Kidney
15 Int., 33, 652-655; HARRIS, R.B. et al (1985) J. Biol.
Chem., 260, 2208-2211; IWATA, K. et al (1982) Biochem.
Biophys. Res. Commun, 107, 1097-1103 ; IWATA, K. et al
(1983) Arch. Biochem. Biophys., 227, 188-201 ; ST
20 CLAIR, D.K. et al (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun,
141, 968-972 ; SOFFER, RL. et al (1987) Clin. Exp. Hyp.
A9, 229-234).

Quelques essais de clonage de l'ADN codant pour
l'ECA animale ont été effectués à partir de deux
25 organes riches en ECA, les reins et les poumons, mais
aucun acide nucléique complet codant pour l'ECA animale
n'a cependant été décrit ; seuls quelques fragments
d'un tel acide nucléique ont été décrits (DELUCA-
FLAHERTY, C. et al (1987) Int. J. Peptide Protein Res.,
30 29, 678-684 ; BERNSTEIN K.E. et al, (1988 J. Biol.
Chem., 263, 11021-11024)). Les quantités d'ARN messager
(ARNm) codant pour l'ECA sont probablement trop faibles
dans ces organes pour permettre le clonage d'un ADN
complémentaire (ADNc) de c t ARNm. Aucun essai de

clonage de l'ADN codant pour l'ECA humaine n'a été décrit jusqu'à maintenant.

5 Bien que le rôle physiologique de l'ECA dans les
tissus extra-vasculaires ne soit pas encore connu, il
est désormais bien établi que cette enzyme que l'on
retrouve dans l'endothélium vasculaire et dans le
plasma, joue un rôle essentiel dans l'homéostasie
10 circulatoire par son action de clivage du dipeptide
carboxy-terminal de l'angiotensine I, activant ainsi
cette dernière en la transformant en angiotensine II
qui est un peptide vasoconstricteur, stimulant la
production d'aldostérone, et facilitant la transmission
adrénergique.

15 Etant donné le rôle essentiel de l'angiotensine II
dans le contrôle de la pression artérielle, une
recherche active s'est développée sur la synthèse
d'inhibiteurs de l'ECA. Le captopril a été le premier
inhibiteur oral de l'ECA, suivi par de nombreux autres
20 composés. Actuellement, les inhibiteurs de l'ECA
occupent une place importante dans le traitement de
l'hypertension artérielle. La structure complète de
l'ECA n'étant pas connue, les inhibiteurs sus-mentionnés
ont été conçus sur la base de la structure de protéases
25 à zinc possédant des propriétés enzymatiques voisines
de celles de l'ECA, notamment sur la base de la
structure du site actif de la carboxypeptidase A
(ONDETTI, M.A. et al (1977) Science, 196, 441-444).

30 Ainsi, en l'absence d'indication précise sur la
structure de l'ECA, et plus particulièrement sur le ou
les site(s) actif(s) de cette dernière, on conçoit
facilement que les inhibiteurs de l'ECA sus-mentionnés
synthétisés sur la base d'analogies avec la structure
35 d'autres enzymes, peuvent être des molécules

insuffisamment actives, ou non totalement spécifiques de l'ECA et susceptibles de posséder une action thérapeutique insuffisante, ou de créer des effets secondaires indésirables. Parmi ces effets indésirables, on distinguera notamment des phénomènes de toux, de troubles digestifs, d'éruptions cutanées qui peuvent être liés à l'inhibition d'autres systèmes enzymatiques par les inhibiteurs de l'ECA sus-mentionnés.

Un des buts de la présente invention est de permettre la conception de nouveaux inhibiteurs de l'ECA plus puissants et spécifiques de cette dernière que ne le sont les actuels inhibiteurs sus-mentionnés, permettant éventuellement une meilleure efficacité à dose moindre, et limitant les risques d'effets indésirables de ces nouveaux inhibiteurs.

La présente invention a pour objet Le clonage et le séquençage de l'acide nucléique codant pour l'ECA humaine ; ce travail a été réalisé à partir de deux banques d'ADN complémentaires d'ARNm provenant de cellules endothéliales de veines ombilicales humaines et de sondes nucléotidiques déduites à partir de séquences peptidiques obtenues par séquençage de fragments purifiés de l'ECA humaine. Les techniques utilisées pour le clonage et le séquençage de l'acide nucléique selon l'invention seront plus particulièrement décrites dans la description détaillée de l'invention.

Il sera fait référence dans ce qui suit, au tableau I et aux figures dans lesquels :

- le tableau I représente les fragments peptidiques obtenus à partir de l'ECA humaine purifiée.

5 - la figure 1 représente la comparaison des séquences en acides aminés aminoterminales de l'ECA humaine, et des ECA provenant de lapins, de boeuf, de porc et de souris ;

10 - la figure 2 représente les positions respectives des acides nucléiques des trois clones utilisés pour la détermination de l'acide nucléique codant pour l'ECA humaine;

15 - la figure 3 représente l'acide nucléique ainsi que le polypeptide, déduit de ce dernier, correspondant à l'ECA humaine ;

20 - la figure 4 représente les homologues entre certaines séquences peptidiques de l'ECA humaine (ECAh), de la thermolysine (THERM), de l'endopeptidase neutre de rat ou de lapin (rNEP), et de la collagénase de fibroblastes de peau humaine (COLLh) ;

25 Une étude approfondie de l'acide nucléique de l'invention, ainsi que du polypeptide déduit à partir de ce dernier et correspondant à l'ECA humaine, conduit aux observations suivantes :

30 - la phase de lecture ouverte de l'acide nucléique de la figure 3 est constituée d'une séquence d'ADN délimitée par les nucléotides correspondant aux positions 23 et 109 de la figure 1 codant pour un peptide signal de 29 acides aminés, et d'une séquence d'ADN délimitée par les nucléotides situés aux positions 110 à 3940 de la figure 3, et codant pour une protéine mature de 1277 acides aminés ;

35 - l'acide nucléique de l'invention est caractérisé par une forte homologie interne (supérieure à 60 %) entre la séquence d'ADN délimitée par les nucléotides situés aux positions 700 et 1770, et celle délimitée par les nucléotides situés aux positions 2495 et 3565.

Les polypeptides de 257 acides aminés codés respectivement par les deux séquences d'ADN sus-
5 mentionnées présentent également une forte homologie entre eux (de l'ordre de 67,7 %). la plus forte homologie se situe au niveau des acides aminés des parties centrales des deux polypeptides sus-mentionnés ; par exemple le polypeptide délimité par les acides
10 aminés situés aux positions 361 et 404, et celui délimité par les acides aminés situés aux positions 951 et 1002, présentent un pourcentage d'homologies de l'ordre de 89 %. Les deux polypeptides homologues comprennent chacun une séquence His-Glu-Met-Gly-His
15 correspondant aux acides aminés situés aux positions 361 à 365 et 959 à 963 de la figure 3. Une étude comparative (représentée sur la figure 4) de cette dernière séquence peptidique de 5 acides aminés aminés, avec les sites actifs de plusieurs enzymes dont la
20 thermolysine, suggère le fait que l'une au moins de ces deux séquences de 5 acides aminés, que l'on retrouve dans les deux parties homologues de l'ECA, pourrait constituer une partie du site actif de cette dernière ;
- le produit de la phase ouverte de lecture sus-
25 mentionnée comprend 17 sites potentiels de glycosylation, dont la plupart sont groupés dans la région N-terminale de la molécule, et dans la région localisée à la jonction entre les deux domaines d'acides aminés homologues sus-mentionnés.

30 La présente invention concerne donc tout acide nucléique comprenant la séquence nucléotidique de la figure 3 codant pour l'ECA humaine.

L'invention concerne plus particulièrement tout
35 acide nucléique comprenant la séquence d'ADN délimitée par les nucléotides situés aux positions 23 et 3940 de

la figure 3, et codant pour la pré-ECA humaine de 1306
acides aminés ; les 29 premiers acides aminés du côté
N-terminal représentent le peptide signal, et les 1277
5 acides aminés restant représentent l'ECA humaine
nature.

L'invention concerne également tout acide
nucléique comprenant la séquence d'ADN délimitée par
les nucléotides situés aux positions 110 et 3940 de la
10 figure 3, et codant pour l'ECA humaine mature.

L'invention a également pour objet tout acide
nucléique issu de la séquence d'ADN de la figure 3 et
codant pour un polypeptide susceptible de posséder des
propriétés enzymatiques du type de celles de l'ECA
15 humaine, notamment un polypeptide capable d'hydrolyser
l'angiotensine I et/ou les kinines, notamment la
bradykinine, ou tout acide nucléique ne se distinguant
du précédent au niveau de sa séquence nucléotidique que
par des substitutions de nucléotides n'entraînant la
20 modification de la séquence en aminoacides du susdit
polypeptide dans des conditions propres à lui faire
perdre les susdites propriétés.

A ce titre, l'invention concerne plus
particulièrement tout acide nucléique comprenant l'une
ou l'autre des régions homologues de l'ECA sus-
25 mentionnées.

Parmi les acides nucléiques conformes à
l'invention, on citera notamment tout fragment d'ADN
contenant :

30 - une séquence d'ADN s'étendant entre, d'une part,
un nucléotide situé entre les positions 1 à 1177 et,
d'autre part, un nucléotide situé entre les positions
3070 à 3940 ;

5 - une séquence d'ADN s'étendant entre, d'une part,
un nucléotide situé entre les positions 110 à 1177, et
d'autre part un nucléotide situé entre les positions
1276 à 1966 ;

10 - une séquence d'ADN s'étendant entre, d'une part,
le nucléotide situé entre les positions 1967 à
2971, et, d'autre part, le nucléotide situé entre les
positions 3070 à 3940.

15 L'invention concerne aussi les acides nucléiques
dont les séquences nucléotidiques sont modifiées dans
les limites autorisées par la dégénérescence du code
génétique, dès lors que les polypeptides codés par ces
acides nucléiques conservent soit une structure
primaire identique, soit leurs propriétés enzymatiques
ou immunologiques.

20 De telles modifications non limitatives conduisent
par exemple à des acides nucléiques variants qui se
distinguent des acides nucléiques ci-dessus :

- par addition et/ou
- suppression d'un ou de plusieurs nucléotides
et/ou
- modification d'un ou de plusieurs nucléotides.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet
tout acide nucléique présentant la caractéristique de
s'hybrider spécifiquement avec l'acide nucléique
représenté sur la figure 3, dans les conditions
définies ci-après :

- 30 - traitement de préhybridation du support (filtre
de nitrocellulose ou membrane de nylon), sur lequel est
fixé l'acide nucléique susceptible de s'hybrider avec
celui de la figure 3, à 65°C pendant 6 heures avec une
solution ayant la composition suivante : 4 x SSC,
35 10 x Denhardt,

- remplacement de la solution de pré-hybridation au contact du support par une solution tampon ayant la composition suivante : 4 x SSC, 1 x Denhardt, 25 mM NaPO₄, pH 7, 2 mM EDTA, 0,5 % SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué, comprenant l'acide nucléique de la figure 3 en tant que sonde, notamment de manière radioactive, et préalablement dénaturée par un traitement à 100°C pendant 3 minutes,

- incubation pendant 12 heures à 65°C,

- lavages successifs avec les solutions suivantes :

. 2 x SSC, 1 x Denhardt, 0,5 % SDS, pendant 45 minutes à 65°C à quatre reprises,

. 0,2 x SSC, 0,1 x SSC pendant 45 minutes à 65°C à deux reprises,

. 0,1 x SSC, 0,1 % SDS pendant 45 minutes à 65°C.

Il est à rappeler que la composition de la solution de Denhardt est la suivante : 1 % ficoll, 1 % polyvinylpyrrolidone, 1 % BSA (albumine de sérum de boeuf), et que 1 x SSC est constituée de 0,15 M de NaCl et 0,015 M de citrate de sodium, pH 7.

L'invention concerne également tout acide nucléique présentant la caractéristique de s'hybrider spécifiquement avec l'acide nucléique de la figure 3 dans des conditions non stringentes reprenant les caractéristiques essentielles des conditions stringentes définies ci-dessus, sauf pour ce qui concerne la température qui est de 40°C dans les conditions non stringentes, et les lavages successifs qui, dans les conditions non stringentes, sont réalisés à l'aide de 2 x SSC à 45°C pendant 15 minutes à 2 reprises.

L'invention vise également les sondes nucléotidiques susceptibles de s'hybrider avec les acides nucléiques décrits précédemment, ou leurs séquences

complémentaires, ainsi qu'avec l'ARN messager codant pour l'ECA et avec le gène humain responsable de l'expression de l'ECA, dans les conditions d'hybridation définies ci-dessus.

Il va de soi que les conditions d'hybridation stringentes ou non stringentes, définies ci-dessus constituent des conditions préférées pour l'hybridation, mais ne sont nullement limitatives et peuvent être modifiées sans affecter pour autant les propriétés de reconnaissance et d'hybridation des sondes et des acides nucléiques sus-mentionnés.

Les conditions salines et de température, au cours de l'hybridation et du lavage des membranes, peuvent être modifiées dans le sens d'une plus grande ou d'une plus faible stringence sans que la détection de l'hybridation en soit affectée. Par exemple, il est possible d'ajouter de la formamide pour abaisser la température au cours de l'hybridation.

L'invention concerne également le polypeptide dont la séquence en acides aminés est représentée sur la figure 3, ainsi que tous les polypeptides susceptibles de posséder une activité enzymatique du type de celle de l'ECA et qui sont codés par les fragments d'ADN sus-mentionnés issus de l'acide nucléique de la figure 3.

Parmi les polypeptides sus-mentionnés, on distinguera notamment :

- le polypeptide s'étendant entre les acides aminés correspondant aux positions 1 et 619 de la figure 3 ;

- le polypeptide s'étendant entre les acides aminés correspondant aux positions 620 et 1229 ;

- le polypeptide s'étendant entre les acides aminés correspondant aux positions 350 et 395 ;

5 - le polypeptide s'étendant entre les acides aminés correspondant aux positions 948 et 993.

Les polypeptides précédents peuvent être modifiés dès lors qu'ils conservent les propriétés biochimiques ou immunologiques ou pharmacologiques définies précédemment.

10 Par exemple, et de façon non limitative, des polypeptides dans le cadre de l'invention peuvent se distinguer des polypeptides définis ci-dessus ;

- par addition et/ou

15 - suppression d'un ou plusieurs acides aminés et/ou

- modification d'un ou de plusieurs acides aminés, sous réserve que les propriétés biochimiques ou immunologiques ou pharmacologiques comme indiqué ci-dessus soient conservées.

20 On conçoit que l'homme de métier dispose de la possibilité d'identifier, voire de sélectionner ceux des polypeptides de séquences plus courtes qui entrent dans le champ de l'invention. A titre de l'un des
25 moyens généraux lui permettant de procéder à cette identification, on mentionnera, par exemple, le traitement du polypeptide de la figure 3 avec une protéase clivant le polypeptide sus-mentionné dans un site peptidique choisi, soit dans une région N-terminale, soit dans une région C-terminale, suivi de
30 la séparation du fragment N-terminal ou du fragment C-terminal du restant dudit polypeptide, ce "restant" étant alors testé pour son activité enzymatique vis-à-vis d l'angiotensine et/ou de la bradykinine. En cas
35 de réponse positive, l'on aura alors établi que le

fragment N-terminal ou C-terminal, ne jouait pas un rôle significatif, sinon essentiel pour la manifestation des propriétés enzymatiques dudit polypeptide. L'opération peut éventuellement être répétée pour autant que l'on dispose d'une protéase susceptible de reconnaître un autre site spécifique proche d'une extrémité N-terminale ou C-terminale du polypeptide restant. La perte par le polypeptide plus petit reconnu des propriétés enzymatiques du fragment plus long dont il était issu peut conduire à l'hypothèse que le dernier fragment séparé jouait un rôle significatif dans la manifestation des propriétés enzymatiques du polypeptide de la figure 3.

Une autre variante, plus simple que la précédente, de détection des régions de l'ECA essentielles à la manifestation des activités enzymatiques de cette dernière, peut être basée sur des traitements enzymatiques d'un acide nucléique codant pour l'ECA, avant l'incorporation de l'acide nucléique ainsi obtenu, et présumé coder pour un polypeptide possédant des activités enzymatiques du type de celle de l'ECA, dans le vecteur d'expression utilisé pour la mise en oeuvre d'un procédé de production dudit polypeptide dans l'hôte cellulaire approprié (procédé qui sera plus particulièrement détaillé dans ce qui suit). Ce traitement enzymatique peut alors consister soit en un émondage des extrémités de l'acide nucléique initial (codant par exemple pour le polypeptide de la figure 3 en entier), par exemple par une enzyme exonucléolytique, telle que Bal31, soit par une ou plusieurs enzymes de restriction choisie pour leurs sites de reconnaissance respectifs (le cas échéant aménagés par mutagenèse ponctuelle dirigée) dans la

séquence de l'acide nucléique initial, soit par l'addition d'un fragment d'ADN synthétique de jonction entre le site de coupure de l'enzyme de restriction et le début de la région à exprimer. L'acide nucléique tronqué obtenu peut alors être testé, après incorporation dans le vecteur choisi et transformation de l'hôte cellulaire avec le vecteur recombinant obtenu, pour sa capacité à exprimer un polypeptide tronqué correspondant, possédant encore les susdites propriétés enzymatiques -- ou au contraire ne les possédant plus, d'où la possibilité, comme dans la variante précédente, d'identifier au sein du polypeptide de la figure 3, les séquences jouant un rôle important, sinon essentiel dans la manifestation des propriétés enzymatiques de l'ECA.

L'invention a également pour objet tout acide nucléique recombinant contenant tout fragment d'ADN du type sus-indiqué codant pour la pré-ECA humaine, ou l'ECA humaine mature, ou encore pour tout polypeptide susceptible de posséder une activité enzymatique du type de celle de l'ECA, associé avec un promoteur et/ou un terminateur de transcription reconnu par les polymérases de la cellule hôte dans laquelle ledit acide nucléique recombinant est susceptible d'être introduit.

L'introduction dudit acide nucléique recombinant dans la cellule hôte, est avantageusement réalisée à l'aide de vecteurs, notamment du type plasmide, qui sont aptes à se répliquer dans ladite cellule hôte et à y permettre l'expression de la séquence codant pour l'enzyme.

Ledit acide nucléique recombinant peut également être introduit dans la cellule hôte à l'aide d'un

5 vecteur viral (virus recombinant) capable d'infecter ladite cellule hôte et d'y permettre l'expression du polypeptide codé par un acide nucléique selon l'invention, ce dernier étant sous le contrôle d'un promoteur viral actif dans la cellule hôte.

10 L'invention concerne donc un procédé de production de l'ECA humaine, ou des polypeptides sus-mentionnés issus de l'ECA, qui comprend la transformation des cellules hôtes au moyen des vecteurs sus-indiqués, la mise en culture des cellules hôtes transformées dans un milieu approprié et la récupération desdits polypeptides soit directement à partir du milieu de culture, lorsque ces derniers y sont secrétés
15 (notamment dans le cas où les polypeptides considérés sont précédés d'une séquence signal lors de leur synthèse dans la cellule hôte), soit après lyse de la paroi de la cellule hôte dans le cas où les polypeptides ne seraient pas secrétés hors de cette
20 dernière.

Le procédé sus-mentionné comprend avantageusement une étape finale de purification, par exemple selon les techniques de chromatographie hydropathe et d'affinité en faisant appel à un inhibiteur de toute ou partie de
25 l'ECA fixé sur la colonne (cf. description détaillée qui suit).

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet une composition contenant de l'ECA humaine pure, exempte de contaminants notamment de nature
30 protéique.

Les cellules hôtes utilisées pour la mise en oeuvre du procédé sus-mentionné peuvent être des cellules procaryotes, notamment des cellules de E. coli, ou, d'une manière plus avantageuse, des cellules
35

eucaryotes, qui permettent, notamment, d'obtenir des protéines sous leur forme glycosylée et mature (levures, cellules CHO, ou cellules d'insectes infectées par le baculovirus).

5 Ce procédé décrit ci-dessus est également réalisable par transfection des cellules hôtes avec des vecteurs d'expression ayant intégré un gène modifié de l'ECA. Soit qu'il s'agisse de parties tronquées de l'ADN complémentaire de l'ARN messager endothélial de
10 l'ECA, comprenant par exemple un seul des deux domaines homologues, ou bien amputé de l'extrémité 3' codant pour le segment hydrophobe d'insertion membranaire. La transfection des cellules hôtes est également réalisable avec des vecteurs comprenant une forme mutée
15 de l'ECA, ou de ses fragments, les mutations portant en particulier sur les bases codant pour les acides aminés impliqués dans l'activité enzymatique décrits ci-dessus.

Il est particulièrement avantageux en vue de la
20 cristallisation de l'enzyme recombinante de muter un ou plusieurs sites potentiels de N glycosylation, c'est-à-dire les codons correspondants aux asparagine des séquences asparagine-X-Threonine et asparagine-X-serine de la figure 3 (X représentant tout acide
25 aminé compris entre une asparagine et une Thréonine ou une sérine de la figure 3).

L'invention vise également un procédé de
préparation des nouveaux polypeptides sus-mentionnés par synthèse qui comprend soit l'addition étape par
30 étape des résidus peptidiques choisis, avec l'addition ou l'élimination de groupes protecteurs quelconques des fonctions amino et carboxyle, ou addition de résidus
peptidiques choisis afin de produire des fragments,

suivie d'une condensation desdits fragments en une séquence en acides aminés appropriée, avec addition ou élimination des groupes protecteurs choisis.

L'invention se rapporte également à des anticorps spécifiques dirigés contre les polypeptides ci-dessus. En particulier, l'invention vise des anticorps monoclonaux dirigés contre les séquences peptidiques paraissant impliquées dans au moins une des activités enzymatiques de l'ECA.

De tels anticorps monoclonaux peuvent être produits par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on inocule un des polypeptides ci-dessus à un animal choisi, dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ce polypeptide. Ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on réalise alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis des polypeptides de l'invention pourront être testés par exemple sur colonne d'affinité.

Parmi les polypeptides utilisés pour la fabrication des anticorps monoclonaux sus-mentionnés, on mentionnera notamment ceux délimités par les acides aminés situés aux positions 350 et 395, ou 948 et 993 de la figure 3.

L'invention concerne également une méthode de dépistage, ou de dosage, in vitro d'un ECA, et plus particulièrement de l'ECA humaine, ou d'un produit dérivé de l'ECA tel que les polypeptides sus-mentionnés
5 ayant in vivo les propriétés de l'ECA, dans un prélèvement biologique susceptible de les contenir. Une telle méthode de dépistage selon l'invention, peut être réalisée soit à l'aide des anticorps monoclonaux sus-mentionnés, soit à l'aide des sondes nucléotidiques décrites ci-dessus.
10

Le prélèvement biologique sus-mentionné est effectué soit dans des tissus fluides, tels que le sang, soit dans des organes, ce dernier type de prélèvement permettant notamment d'obtenir des coupes
15 fines de tissus sur lesquelles les anticorps sus-mentionnés sont ultérieurement fixés.

La méthode de dosage selon l'invention, procédant par l'intermédiaire des anticorps sus-mentionnés comprend notamment les étapes suivantes :

20 - la mise en contact d'un anticorps reconnaissant spécifiquement l'ECA ou un polypeptide dérivé de l'ECA selon l'invention, avec le susdit prélèvement biologique dans des conditions permettant la production éventuelle d'un complexe immunologique formé entre
25 l'ECA ou produit qui en est dérivé et l'anticorps sus-mentionné ;

- la détection à l'aide de tout moyen approprié du susdit complexe immunologique.

Avantageusement, les anticorps utilisés pour la
30 mise en oeuvre d'un tel procédé sont marqués notamment de manière enzymatique ou radio-active.

Une telle méthode selon l'invention peut notamment être réalisée suivant la méthode ELISA (enzyme linked sorbent assay) qui comprend les étapes suivantes :

- fixation d'une quantité prédéterminée
5 d'anticorps sur un support solide, notamment à la surface d'un puits d'une microplaque ;
- addition du prélèvement biologique (sous forme liquide) sur ledit support ;
- incubation pendant une temps suffisant pour
10 permettre la réaction immunologique entre lesdits anticorps et l'ECA ou produit qui en est dérivé sus-mentionné ;
- élimination des parties non fixées du
prélèvement biologique et lavage du support solide (en
15 particulier des puits de la microplaque) ;
- addition d'une immunoglobuline marquée par une enzyme susceptible d'activer un substrat spécifique de cette enzyme,
- addition du substrat spécifique de l'activité
20 enzymatique libérée lors de la réaction immunologique précédente ;
- détection, à l'aide de tout moyen approprié, de la dégradation du substrat par l'enzyme ; et
- corrélation de la quantité d'enzymes libérées à
25 la concentration d'ECA humaine initialement présente dans le prélèvement biologique.

Selon un autre mode de réalisation de la méthode de dosage de l'invention, les anticorps sus-mentionnés ne sont pas marqués et la détection des complexes
30 immunologiques formés entre les polypeptides et lesdits anticorps est réalisée à l'aide d'une immunoglobuline marquée reconnaissant lesdits complexes.

La méthode de dosage selon l'invention peut également être réalisée par une technique immuno-enzymatique suivant un mécanisme de compétition entre les polypeptides susceptibles d'être contenus dans le
5 prélèvement biologique, et des quantités prédéterminées de ces mêmes polypeptides, vis-à-vis des anticorps sus-mentionnés. Dans ce dernier cas, les polypeptides de l'invention en quantité prédéterminée sont avantageusement marqués à l'aide d'un marqueur
10 enzymatique.

L'invention ne se limite nullement aux modes de réalisation décrits ci-dessus pour le dosage in vitro des polypeptides de l'invention, ce dosage pouvant être réalisé à l'aide de toute autre méthode immunologique
15 appropriée.

L'invention concerne également une méthode de dépistage, ou de dosage, in vitro d'un acide nucléique codant pour toute ou partie de l'ECA, réalisée à partir d'un prélèvement biologique susceptible de contenir
20 ledit acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'une sonde nucléotidique décrite ci-dessus avec le susdit prélèvement biologique dans des conditions permettant la production éventuelle
25 d'un complexe d'hybridation formé entre l'acide nucléique et ladite sonde ;

- la détection à l'aide de tout moyen approprié du susdit complexe d'hybridation.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le
30 prélèvement biologique sus-mentionné est, préalablement à la mise en oeuvre du dépistage, traité de manière à ce que les cellules qu'il contient soient lysées et, éventuellement, en ce que le matériel

génomique contenu dans lesdites cellules soit fragmenté à l'aide d'enzymes de restriction du type EcoRI, BamHI etc..., ou que les ARN en soient isolés.

Avantageusement, les sondes nucléotidiques de l'invention sont marquées à l'aide d'un marqueur enzymatique ou radio-actif. Les ADN, ou ARN, issus du prélèvement biologique sont placés sur un support approprié, notamment sur un filtre de nitrocellulose ou autre, par exemple membrane de nylon, sur lequel sont ensuite additionnées les sondes sus-mentionnées.

Selon un autre mode avantageux de réalisation du procédé sus-mentionné de l'invention, des coupes histologiques sont réalisées à partir du susdit prélèvement biologique et les sondes nucléotidiques de l'invention sont mises en contact direct avec des coupes histologiques pour la détection des acides nucléiques de l'invention par hybridation in situ.

L'invention a également pour objet l'application des méthodes de dépistage, ou de dosage, sus-mentionnées au diagnostic in vitro de pathologies telles que l'hypertension, la sarcoïdose et autres maladies granulomateuses, les dysfonctionnements thyroïdiens et d'une manière générale toutes maladies corrélées à des teneurs dans l'organisme (dans le plasma ou d'autres tissus) en séquences d'acides aminés de l'invention, situées à l'extérieur du domaine délimité par les valeurs extrêmes correspondant généralement à l'état physiologique d'un individu sain.

Les méthodes de dosage in vitro de l'invention procédant à l'aide des anticorps sus-mentionnés permettent également le suivi dans l'organisme de la concentration des inhibiteurs de l'ECA par mesure de la quantité d'anticorps n'ayant pu se fixer sur le, ou les,

site(s) actif(s) de l'ECA qui sont masqués par l'inhibiteur. Les méthodes de dosage de l'invention sont donc particulièrement avantageuses dans le cadre de la surveillance des traitements de patients par des inhibiteurs de l'ECA.

L'invention a également pour objet des nécessaires ou kits pour la mise en oeuvre des méthodes de dépistage, ou de dosage, in vitro sus-mentionnés.

A titre d'exemple, de tels kits comprennent notamment:

- une quantité déterminée d'un des anticorps monoclonaux sus-mentionnés susceptible de donner lieu à une réaction immunologique spécifique avec l'ECA ou avec un des polypeptides dérivés de l'ECA selon l'invention ;

- et/ou une quantité déterminée d'ECA ou un polypeptide susceptible de donner lieu à une réaction immunologique avec les anticorps sus-mentionnés ;

- avantageusement, un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre l'ECA ou les polypeptides de l'invention et les anticorps sus-mentionnés ;

- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques produits lors de la réaction immunologique sus-mentionnée.

Dans le cadre de la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro utilisant des sondes nucléotidiques, les kits utilisés comprennent par exemple :

- une quantité déterminée d'une des sondes nucléotidiques sus-mentionnées susceptible de donner lieu à une réaction d'hybridation avec un des acides

nucléiques sus-mentionnés codant pour l'ECA ou un polypeptide dérivé de l'ECA selon l'invention ;

- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation produits lors de la réaction d'hybridation sus-mentionnée.

L'invention concerne également l'utilisation du polypeptide de la figure 3 ou de tout fragment peptidique approprié issu de ce dernier, pour la conception de nouveaux inhibiteurs de l'ECA humaine, plus puissants et/ou spécifiques de cette dernière que ne le sont les actuels inhibiteurs de l'ECA.

L'invention a également pour objet une méthode de détection ou de dosage, d'un inhibiteur de l'ECA, ou de quantification de son pouvoir inhibiteur, qui comprend la mise en contact du polypeptide de la figure 3, ou de tout fragment peptidique issu de ce dernier et possédant une activité enzymatique du type de celle de l'ECA, avec ledit inhibiteur, et la détermination du coefficient d'inhibition de l'enzyme par l'inhibiteur, notamment par mesure de l'éventuelle activité enzymatique résiduelle sur un substrat approprié de l'ECA.

L'invention concerne également l'utilisation du polypeptide de la figure 3, ou de tout fragment de ce dernier capable d'hydrolyser les kinines, notamment la bradykinine, dans le traitement des maladies inflammatoires, ou infectieuses, de la pancréatite aigue, et plus généralement de maladies où une libération de kinines dans l'organisme pourrait jouer un rôle pathogène.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement des compositions pharmaceutiques pour le traitement des maladies indiquées ci-dessus,

caractérisée par l'association de tout ou partie du polypeptide d la figure 3, capable d'hydrolyser les kinines, notamment la bradykinine, avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des sondes nucléotidiques de l'invention, capables de s'hybrider avec le gène responsable de l'expression de l'ECA humaine dans les conditions décrites ci-dessus, pour la détermination des différentes formes alléliques du gène sus-mentionné.

Les hypertensions artérielles (HTA) sont classées en deux grandes catégories selon leurs étiologies : les HTA secondaires et l'HTA essentielle. Les HTA secondaires regroupent toutes les formes d'HTA que la médecine peut rattacher de façon univoque à une pathologie identifiée. Il peut s'agir, notamment, d'une hypersécrétion hormonale d'origine tumorale (rénine ou aldostérone, catécholamines, par exemple) ou vasculaire (sténose d'une artère rénale provoquant une hypersécrétion de rénine). Ces formes d'HTA secondaires représentent environ 5 % du total des HTA. Sous le vocable d'HTA essentielle, sont regroupées toutes les formes d'HTA pour lesquelles aucune étiologie n'est aujourd'hui identifiable et qui constituent les 95 % restant des cas d'HTA.

La pathogénie de l'HTA essentielle n'est pas aujourd'hui connue mais de nombreuses études ont montré que des facteurs génétiques étaient impliqués dans le développement de l'HTA. Les études familiales ont montré qu'il existait une agrégation familiale des valeurs de pression artérielle et qu'une corrélation existe entre la pression artérielle des parents et des enfants naturels alors que cette corrélation n'existe

pas avec les enfants adoptés. Les études menées sur des jumeaux mono ou dizygotes ont également confirmé l'hérédité du niveau de pression artérielle. Enfin, l'analyse génétique de la transmission du niveau de pression artérielle, chez l'homme et dans les souches de rats génétiquement hypertendus, a montré que plusieurs gènes étaient impliqués. La transmission de ce caractère, variable entre les individus, qu'est le niveau de pression artérielle passe donc par la transmission de formes alléliques de gènes entre les parents et les enfants. Les gènes que l'on peut désigner "candidats" à la responsabilité de cette transmission sont, au premier chef, ceux impliqués dans les principaux systèmes de régulation de la pression artérielle, tels que les gènes, du système rénine-angiotensine, dont celui codant pour l'ECA.

La méthode de choix pour reconnaître, aujourd'hui, les formes alléliques d'un gène est d'identifier, pour ce gène, le polymorphisme de taille des fragments de restriction de ce gène (par taille des fragments de restriction on entend le nombre de paires de bases que comprennent lesdits fragments). Pour ce type d'expérience, les ADN de plusieurs individus sont isolés, clivés par une enzyme de restriction, transférés sur une membrane capable de les fixer de façon irréversible, et hybridés avec une sonde d'ADN marquée correspondant au gène étudié.

Cette méthode permet de distinguer les formes alléliques d'un même gène qui diffèrent entre elles d'un individu à l'autre :

- par leur carte de restriction, et/ou
- par la présence dans l'une des formes alléliques d'une insertion (fragment d'ADN supplémentaire dans

l'allèle le moins fréquent), ou d'une délétion (fragment d'ADN manquant dans l'allèle le moins fréquent) cette insertion n'existant pas chez les autres formes alléliques.

Dans le premier cas sus-mentionné (différences fondées sur la carte de restriction, ou encore polymorphismes de sites de restriction), sous l'effet de la digestion par une enzyme de restriction donnée X, l'allèle possédant, au niveau d'une région précise du génome, un site de restriction reconnu par cette enzyme est coupé par ladite enzyme, et celui ne possédant pas un tel site, au niveau de ladite région, n'est pas clivé. A l'aide d'une sonde nucléotidique susceptible de s'hybrider au niveau de ladite région, on peut donc détecter deux fragments de restriction de tailles différentes selon que la région concernée a été clivée ou non. A chacune de ces tailles correspond une forme allélique.

Dans le second cas (présence d'une insertion, ou d'une délétion), les fragments d'ADN génomique correspondant aux deux formes alléliques sont clivés par l'enzyme de restriction X au niveau d'un site identique. On peut détecter, à l'aide d'une sonde telle que définie dans le paragraphe précédent, deux fragments de restriction de tailles différentes. A chacune de ces tailles correspond une forme allélique, la taille la plus élevée correspondant à la forme allélique comprenant l'insertion sus-mentionnée.

Dans les deux cas précédents et chaque fois que l'on détecte des fragments de restriction de tailles différentes (ou encore fragments de restriction polymorphes) dans un gène donné et d'un individu à l'autre sous l'effet de l'action d'une enzyme de

restriction X, il sera fait référence au "polymorphisme X" de ce gène (par exemple "polymorphisme EcoRI" si l'enzyme de restriction X est l'enzyme EcoRI, ou polymorphisme TaqI si l'enzyme de restriction est TaqI).

L'étude d'un polymorphisme X d'un allèle choisi, dans une population donnée d'individus, présumés sains, permet de constater l'existence de ce polymorphisme dans une proportion déterminée des individus de cette population. La mesure de cette proportion conduit à ce que l'on appelle ci-après la "fréquence allélique de référence".

Si la fréquence d'un allèle choisi, mesuré suivant la même méthode au sein d'une population d'individus présentant une pathologie déterminée, est différente de la fréquence de référence, on pourra alors émettre l'hypothèse que l'allèle en question est lié à ladite pathologie.

De même, on pourra impliquer un allèle dans le développement de la maladie s'il existe une co-ségrégation entre la transmission de la maladie, dans les familles atteintes et informatives pour le polymorphisme, et la transmission de l'allèle permet d'impliquer cet allèle dans le développement de la maladie. (on dit d'une famille qu'elle est informative pour le polymorphisme si le parent atteint par la maladie est hétérozygote pour le site de restriction ce qui permet de suivre dans la descendance l'allèle responsable de la maladie).

La présente invention concerne les fragments de restriction polymorphes susceptibles de s'hybrider avec une sonde nucléotidique de l'invention, notamment dans les conditions décrites ci-dessus, et qui sont issus du

clivage des différentes formes alléliques du gène codant pour l'ECA à l'aide d'enzymes de restriction déterminées.

5

L'invention concerne plus particulièrement les fragments de restriction polymorphes susceptibles de s'hybrider avec une sonde nucléotidique selon l'invention, elle-même susceptible de s'hybrider avec l'extrémité 5' de l'acide nucléique de la figure 3 et qui sont les suivants :

10

- les fragments de 5,8 kb et de 6 kb correspondant au polymorphisme TaqI,

- les fragments de 8,8 kb et de 9 kb correspondant au polymorphisme DraI,

15

- les fragments de 8,5 kb et de 9 kb correspondant au polymorphisme BglIII,

- les fragments de 10,6 kb et de 11 kb correspondant au polymorphisme KpnI,

20

- les fragments de 8,4 kb et de 8,8 kb correspondant au polymorphisme HindIII,

- les fragments de 4,2 kb et 3,0 kb d'une part, et de 4 kb et 2,7 kb d'autre part, correspondant au polymorphisme BglI,

25

- les fragments de 5,2 kb et de 5,7 kb correspondant au polymorphisme RsaI (avec présence ou non d'un fragment de 3,0 kb),

- les fragments de 4,3 kb d'une part, et de 2,2 et 2,5 kb d'autre part, correspondant au polymorphisme PvuII,

30

- les fragments de 3,5 kb et de 3 kb correspondant au polymorphismes XbaI,

- les fragments de 4,3 kb et de 2,7 kb correspondant au polymorphisme TaqI.

35

La différence de taille des fragments alléliques reconnus par les sondes de l'invention chez les différents individus, correspond à une insertion d'un
5 fragment génomique d'environ 400 paires de base avec la marge d'erreur due à l'analyse de taille de ces fragments par électrophorèse sur gel d'agarose.

Cette insertion peut être détectée à l'aide de toute enzyme de restriction clivant l'acide nucléique
10 sus-mentionné du moment que les fragments engendrés soient capables de s'hybrider au moins en partie, avec la sonde correspondante.

La présente invention concerne un procédé de dépistage, in vitro des polymorphismes du gène codant
15 pour l'expression de l'ECA humaine, réalisé à partir d'échantillons biologiques, tels que le sang, susceptibles de contenir de l'ADN génomique, et qui ont été prélevés dans une population donnée d'individus ne présentant pas d'HTA (ou encore individus normotendus),
20 ou d'autres maladies de l'endothélium vasculaire.

Les échantillons sus-mentionnés sont analysés suivant la méthode suivante comprenant :

- le traitement des acides nucléiques issus des échantillons biologiques sus-mentionnés à l'aide d'une
25 enzyme de restriction déterminée dans des conditions permettant l'obtention de fragments de restriction issus du clivage desdits acides nucléiques au niveau de leurs sites de restriction reconnus par ladite enzyme,

- la mise en contact d'une sonde nucléotidique
30 selon l'invention susceptible de s'hybrider avec les fragments sus-mentionnés dans des conditions permettant la production éventuelle de complexes d'hybridation entre ladite sonde et les fragments de restriction

sus-mentionnés, notamment dans les conditions d'hybridation définies ci-dessus,

5 - la détection des susdits complexes d'hybridation,

- la mesure de la taille des éventuels fragments de restriction polymorphes engagés dans les complexes d'hybridation sus-mentionnés.

10 Parmi les sondes utilisées pour la mise en oeuvre d'un tel procédé, on citera notamment l'ADN complémentaire (ou ADNc) de l'acide nucléique décrit à la figure 3, ou, avantageusement, une fraction de cette ADNc susceptible de s'hybrider avec les différents
15 fragments de restriction correspondant aux différentes formes alléliques du gène de l'ECA.

Avantageusement, la sonde utilisée dans le procédé sus-mentionné est marquée, notamment de manière radioactive ou non radioactive, sous forme notamment de sonde biotinylée, pour permettre la détection des
20 différents fragments de restriction restant hybridés avec ladite sonde.

La mesure de la taille des différents fragments de restriction polymorphes engagés dans des complexes d'hybridation avec la sonde sus-mentionnée, peut être
25 réalisée par toute méthode connue en soi par l'homme du métier ; la détermination de la taille de ces fragments de restriction est réalisée notamment par électrophorèse sur gel d'agarose et évaluation de la
30 taille desdits fragments par rapport à celles de fragments témoins.

La comparaison des tailles des fragments de restriction mesurées chez les individus de la population étudiée, permet d'établir, au sein de cette

population d'individus, les fréquences alléliques de référence.

5 L'invention concerne également la détection des différentes formes alléliques du gène codant pour l'ECA humaine, susceptibles d'être liées au développement chez un individu d'une HTA, ou autres maladies de l'endothélium vasculaire, notamment de l'athérosclérose. Cette détection est réalisée suivant
10 la même méthode au sein d'une population d'individus présentant une pathologie sus-mentionnée. Si la fréquence d'un allèle mesurée au sein de cette population est différente de la fréquence de référence, on pourra alors émettre l'hypothèse que cet allèle est
15 probablement lié à l'HTA.

De même, on pourra impliquer un allèle dans le développement de la maladie s'il existe, dans les familles atteintes par la maladie et informatives pour le polymorphisme, une coségrégation entre la transmission de certaines formes alléliques du gène de l'ECA et la transmission de l'HTA et/ou des maladies de l'endothélium, notamment de l'athérosclérose.
20

L'invention a également pour objet l'application des résultats de l'étude des polymorphismes du gène codant pour l'ECA humaine au diagnostic in vitro de l'éventuelle prédisposition génétique probable d'un individu à l'hypertension artérielle, ou à d'autres maladies de l'endothélium vasculaire, notamment de l'athérosclérose.
25
30

La méthode de diagnostic in vitro sus-mentionnée comprend la détection éventuelle de fragments de restriction polymorphes, issus du clivage par une enzyme
5 de restriction déterminée d'allèles probablement liés au mécanisme de l'HTA, à l'aide de sondes nucléotidiques selon l'invention, susceptible de s'hybrider avec lesdits fragments de restriction
10 polymorphes.

Les conditions dans lesquelles une telle méthode de diagnostic in vitro peut être mise en oeuvre sont celles décrites dans les articles concernant les techniques de détection des polymorphismes de longueur
15 des fragments de restriction, plus connues encore sous l'abréviation RFLP (Restriction Fragment-length Polymorphism). De telles conditions sont plus particulièrement décrites dans l'article de GUSELLA J.F. 'Recombinant DNA techniques in the diagnosis of
20 inherited disorders" paru dans Journal of Clinical Investigations (1986), 77, 1723-1726.

Selon un aspect avantageux de l'invention, outre le dépistage des polymorphismes du gène codant pour l'ECA humaine, la méthode de diagnostic in vitro sus-
25 mentionnée comprend également le dépistage de polymorphismes d'un ou de plusieurs gènes codant pour des protéines différentes de l'ECA et impliquées dans le mécanisme de la régulation de la pression artérielle.

30 A ce titre, la méthode de diagnostic in vitro selon l'invention comprend le dépistage de polymorphismes du gène de l'ECA, et du gène de la rénine, et/ou du gène de la kallikréine, et/ou du gène de l'ANF.

5 Parmi les polymorphismes sus-mentionnés des gènes codant pour la rénine, la kallikréine, et l'ANF, on citera notamment ceux qui ont été plus particulièrement décrits dans la demande de brevet PCT publiée sous le numéro WO87/02709 déposée le 23 octobre 1987.

10 A l'aide de sondes appropriées, les auteurs de cette demande PCT ont découvert les fragments de restriction suivants :

- 5 kb et 9 kb correspondant au polymorphisme BglI du gène de la rénine,
- 0,9 kb correspondant au polymorphisme BglII du gène de la rénine,
- 15 - 20 kb et 24 kb correspondant au polymorphisme RsaI du gène de la rénine,
- 6,2 kb et 9 kb correspondant au polymorphisme HindIII du gène de la rénine,
- 9,8 kb et 11 kb correspondant au polymorphisme TaqI du gène de la rénine,
- 20 - 3,9 kb correspondant au polymorphisme EcoRI du gène de la rénine,
- 1,4 kb et 1,8 kb correspondant au polymorphisme BanII du gène ANF,
- 25 - 4,1 et 6,2 kb correspondant au polymorphisme BglI du gène ANF,
- 9,1 kb et 6,5 kb correspondant au polymorphisme BglII du gène ANF,
- 5,2 kb et 11,8 kb correspondant au polymorphisme EcoRI du gène ANF,
- 30 - 15 kb correspondant au polymorphisme EcoRI du gène de la kallikréine,
- 3,1 kb correspondant au polymorphisme PstI du gène de la kallikréine,

- 4,5 kb correspondant au polymorphisme StuI du gène de la kallikréine.

5 L'invention a également pour objet des kits pour la mise en oeuvre de la méthode de diagnostic in vitro définie ci-dessus.

A titre d'exemple, de tels kits de diagnostic comprennent :

10 - une quantité déterminée d'une ou de plusieurs enzymes de restriction,

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique susceptible de reconnaître les fragments de restriction issus du clivage du gène codant pour l'ECA par l'(ou les) enzyme(s) sus-mentionné(s),

15 - éventuellement une quantité déterminée d'une sonde susceptible de reconnaître les fragments de restriction issus du clivage du gène codant pour la rénine par l'(ou les) enzyme(s) sus-mentionnés(s),

20 - et/ou une quantité déterminée d'une sonde susceptible de reconnaître les fragments issus du clivage du gène codant pour la kallikréine par l'(ou les) enzyme(s) sus-mentionné(s),

25 -- et/ou une quantité déterminée d'une sonde susceptible de reconnaître les fragments de restriction issus du clivage du gène codant pour l'ANF par l'(ou les) enzyme(s) sus-mentionné(s).

30 Les techniques classiques d'amplification génique, notamment celle décrite dans le brevet US n°4,683,202 déposé le 25/10/1985, sont utilisables pour détecter le polymorphisme du gène codant pour l'ECA en utilisant des amorces s'hybridant avec ce gène de part et d'autre de l'insertion d'environ 400 paires de base sus-mentionnée. Les fragments d'ADN ainsi amplifiés ont une

taille différente selon que le fragment d'ADN génomique contient ou ne contient pas ladite insertion.

5 A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence nucléotidique d'environ 10 à 40 nucléotides issue de la séquence nucléotidique de la figure 3, ou sa séquence complémentaire, ou susceptible de s'hybrider avec une partie de la séquence de la figure 3 ou avec la séquence complémentaire de cette
10 dernière, utilisable en tant qu'amorces pour l'amplification du gène codant pour l'ECA.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit du clonage de l'acide nucléique
15 codant pour l'ECA humaine, ainsi que des sondes utilisées pour ce clonage, étant entendu que cette description ne saurait être interprétée comme tendant à restreindre la portée des revendications.

20 I - PURIFICATION ET SEQUENCAGE DE L'ECA

L'ECA humaine sous sa forme complète membranaire a été purifiée à partir de microsomes rénaux. La fraction microsomale a été préparée à partir d'homogénats de reins de cadavres humains de la façon suivante : 600 g de cortex de rein ont été hachés, suspendus dans un
25 tampon de phosphate de potassium 20 mM, pH 8, contenant 250 mM de saccharose et un mélange d'inhibiteurs de protéase (tétrathionate de sodium 5 mM, N-éthylmaleimide 10 mM, fluorure de phénylméthanesulfonyle 2 mM), et homogénéisés pendant 3 minutes. Les débris de
30 tissu ont été éliminés par centrifugation à 5000 g pendant 20 minutes et la fraction particulaire a été sédimentée par centrifugation à 105000 g pendant 1 heure. Le culot a été resuspendu dans un tampon de phosphate de potassium 150 mM,; pH 8 (tampon I, 200 ml)
35

et traité pendant 18 heures avec le détergent CHAPS 8 mM (Serva). Le surnageant, après centrifugation à 105000 g pendant 1 heure, a été dialysé contre le tampon I pendant 24 heures afin d'éliminer le CHAPS. Puis il a été déposé sur une colonne de phényl-Sépharose 4B (Pharmacia) et élué à un taux de 24 ml/heure ; 60 % de l'activité enzymatique a été retenue sur la colonne et éluee sous forme d'un pic unique après avoir appliqué un gradient linéaire de CHAPS (3-(3-cholamidopropyl)diméthylammonio-1-propanesulfonate) jusqu'à une concentration de 10 mM (800 ml). L'éluat a été enrichi avec du $ZnSO_4$ et du KCl à des concentrations finales de 0,1 mM et de 330 mM respectivement de manière à obtenir une liaison optimale avec l'inhibiteur, puis la purification a été complétée sur une colonne de lysinopril-Sépharose 4B comme il a été décrit dans BULL, H.G. et al, (1985), J. Biol. Chem., 260, 2963-2972.

La protéine ainsi isolée (1,2 mg) a été analysée, après réduction (2 mercaptoéthanol à 5 %) et dénaturation (ébullition pendant 3 minutes), par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans 6 % de gel contenant NaDodSO₄ (LAEMMLI, U.A., (1970), Nature, 227, 680-685).

L'enzyme purifiée hydrolyse l'angiotensine I, la bradykinine et plusieurs substrats synthétiques, et est inhibée par le captopril et d'autres inhibiteurs de l'ECA. la détermination de l'activité enzymatique a été réalisée à l'aide du substrat furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycyl-glycine (FAPGG) dans les conditions décrites dans HOLMQUIST et al (1979), Anal. Biochem., 95, 540-548. Les paramètres de la réaction enzymatique déterminée à pH 7,5 sont de 136 μ m pour K_m et 22100

min.⁻¹ pour Kcat ; un traitement à l'aide de bromure de cyanogène a été utilisé pour cliver l'enzyme au niveau des résidus méthionine générant ainsi des fragments pour le séquençage. L'ECA purifiée (0,5 mg) a été dissoute dans l'acide formique 70 % (0,2 ml) et le bromure de cyanogène (2,0 mg) a été ajouté. Après 16 heures de réaction à température ambiante dans le noir, la solution a été diluée 20 fois avec de l'eau et lyophilisée.

Les fragments peptidiques ont été isolés par HPLC en phase inverse, en utilisant un système de gradient acide trifluoroacétique (TFA)-eau-acetonitrile (tampon A : 0,1 M de TFA dans l'eau ; tampon B : 0,1 % de TFA dans l'acetonitrile ; 1-100 % de B sur 32 minutes, taux d'élution 1 ml.min.⁻¹). Les fractions correspondant à des pics différents ont été séparées et lyophilisées, et séquencées à l'aide d'un séquenceur automatique. Les fragments peptidiques ainsi obtenus ont été regroupés sur le tableau I. La séquence aminoterminale de la protéine a été déterminée par la méthode d'Edman à l'aide d'un séquenceur automatique en utilisant la protéine ECA entière.

La séquence suivante de 16 acides aminés a été obtenue

NH₂-Leu-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Pro-Gly-Asp-Phe-Ser-Ala-Asp-Glu-Ala-Gly-COOH

II - CLONAGE DE L'ADN COMPLEMENTAIRE DE L'ARN MESSAGER

A) Sonde nucléotidique

- à partir de la séquence peptidique

Met-Trp-Ala-Met-Trp-Ala-Gln-Ser-Trp-Glu-Asn-Ile (conçue d'après la séquence CN8b du tableau I), 64 sondes nucléotidiques dénommées HACE6 ont été synthétisées à

l'aide d'un synthétiseur d'ADN automatique en utilisant la méthode au phosphoramidite.

5 Met-Trp-Ala-Lys-Ser-Trp-Glu-Asp-Ile- 3'
TAC-ACC-CGA-TTT-ACG-ACC-CTT-TTG-TA 5'
G G TG C A

10 - Marquage radio-actif : la sonde HACE6 a été marquée au [γ P³²] ATP (activité spécifique : 5000 curies/m mole) à son extrémité 5' par la T4 polynucléotide kinase. L'activité spécifique de la sonde est de 5×10^6 cpm/p mole.

B) Criblage d'une banque d'ADN complémentaires construite à partir d'ARN de cellules endothéliales

15 Une banque d'ADNC de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine amorcée avec de l'oligo(dT), construite dans le phage λ gt11 (Clontech Laboratories Inc.), et constituée de $1,5 \times 10^6$ recombinants indépendants, a été criblée en utilisant la sonde HACE6
20 marqué au P³². L'ADN des phages a été transféré sur filtre de nitrocellulose selon la méthode de Benton et Davis (réf. BENTON, W.D., et DAVIS R.W. (1977), Science (Wash), 196, 180-182). Les hybridations avec HACE6 ont été réalisées dans : $6 \times$ SSC, 0,1 % de NaDodSO₄,
25 tampon NaPO₄ 50 mM à pH 6,8, $5 \times$ Denhardt, 0,1 mg/ml d'ADN dénaturé de sperme de saumon à 50°C. Le lavage final des filtres a été effectué deux fois dans $2 \times$ SSC, 0,1 % SDS, à 55°C pendant 15 minutes.

Dans ces conditions deux différents types de clones hybridant fortement avec la sonde HACE6 ont été
30 obtenus. Il s'agit des clones λ HEC1922 et λ HEC2111. Les fragments d'ADN insérés dans les phages ont été isolés après coupure des phages par l'enzyme de restriction EcoRI, et insérés dans les deux sens dans le plasmide bluescript (Stratagene), au niveau du site EcoRI de ce
35

dernier. A partir de ces plasmides doubles-brins des matrices mono-brins ont été obtenues en réinfectant des cultures bactériennes portant ces plasmides à l'aide d'un phage helper KO7.

La détermination de la séquence nucléotidique de ces clones a été effectué par la méthode de Sanger (SANGER, F. et al (1977), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467) en utilisant soit l'ADN polymérase de klenow, soit l'ADN polymérase de T7 modifiée (Sequenase, US Biochemical). Quelques régions ont été séquencées en utilisant à la place de la déoxyguanosine tri-phosphate (dGTP), le déoxyinosine tri-phosphate (dITP) ou le deaza-déoxyguanosine tri-phosphate (7-deaza dGTP). L'électrophorèse des fragments marqués par le [S^{35}] dATP a été pratiquée sur gel d'urée-polyacrylamide. Les séquences ont été déterminées en synthétisant des oligomères de proche en proche toutes les 350 paires de base environ qui ont servi d'amorces échelonnées le long de la séquence.

Les séquences nucléotidiques insérées dans ces deux phages sont chevauchantes sur une longueur de 2323 paires de base. La séquence peptidique déduite de ces clones contient l'ensemble des séquences peptidiques obtenues par purification de l'ECA humaine, et qui sont représentées sur le tableau I, à l'exception de la région amino-terminale.

De manière à obtenir l'ADN complémentaire correspondant à l'extrémité 5' de l'ARN messager codant pour l'ECA, une autre banque d'ADNc a été construite en utilisant 5 μ g d'ARN poly(A) isolé à partir de cellules endothéliales de la veine ombilicale en culture tertiaire. Ces cellules ont été obtenues par dissociation à l'aide de collagénase comme il est

décrit dans JAFFE et al (JAFFE J.M., et al (1973), J. Clin. Invest., 52, 2745-2756), et ont été cultivées en présence de 20 % de sérum foetal de veau, 100 µg/ml d'héparine et de 2ng/ml de FGF (facteur de croissance de fibroblaste) (GOSPORADOWICZ, D. et al (1983) J. Cell. Biol., 97, 1677-1685). L'ARN total a été extrait des cellules après 3 sous-cultures par la méthode de Chirgwin et al (CHIRGWIN, J.M. et al (1979) Biochemistry, 18, 5294-5299), et purifié sur cellulose oligo-d(T)7 (Pharmacia). La banque d'ADN complémentaire a été construite selon la méthode de Gubler et Hoffman (Gene (1983) 25, 263-269), en utilisant comme amorce un mélange de deux oligonucléotides. Le premier oligonucléotide est une amorce spécifique de l'ARNm de l'ECA, déterminé par la séquence des clones précédemment obtenus. Il s'agit d'un oligomère de 17 bases (CP5-21) complémentaire d'une séquence localisée près de l'extrémité 5' de l'ADNc de l'ECA (nucléotide 234 à 250 de la figure 3). La seconde amorce correspond à l'oligo-d(T)12-18 mers (Pharmacia). Les ADNc ont été traités et insérés dans le phage gGT10 coupé par l'enzyme EcoRI selon la méthode de Koenig et al (KOENIG, M. et al (1987), Cell, 50, 509-517).

Les phages recombinants ont été criblés à l'aide d'un fragment d'ADN génomique humain de 300 paires de base isolé à partir d'une banque génomique clonée dans le phage CHARON4A et qui s'hybride avec CP5-21, et avec l'oligonucléotide de 44 bases obtenu à partir de la séquence amino-terminale déduite de l'ECA purifiée selon la méthode décrite ci-dessus.

Ce fragment de restriction (SacII-SacII) de 300 paires de base comprend la partie la plus 5' terminale de l'ARN messager de l'ECA ; il a été marqué avec une

haute activité spécifique en utilisant la méthode de marquage décrite dans FEINBERG A.P. et al (1983) Anal. Biochem., 132, 6-13, et utilisé pour cribler $1,5 \times 10^6$ clones dans des conditions de stringence élevée.

Parmi les clones positifs obtenus, le clone λ CHDT32 a été sélectionné et séquencé selon la même méthode décrite pour les clones précédents. Il a ainsi été déterminé que ce clone contenait une insertion de 246 paires de base et qu'il démarrait 7 nucléotides en amont de l'amorce CP5-21 et qu'il s'arrêtait 25 nucléotides en amont de l'ATG d'initiation de la traduction.

L'insertion dans ce clone partage 60 paires de base avec le clone λ HEC2111 et contient l'extrémité 5' de la séquence codant pour l'ECA.

La séquence nucléotidique de l'ADNc codant pour l'ECA obtenu par séquençage des trois clones précédents comprend donc 4024 nucléotides. L'extrémité 3' de cette séquence ne contient pas de signal de polyadénylation.

La phase ouverte de lecture partant du premier codon ATG jusqu'au codon stop TGA code pour 1306 acides aminés. La leucine amino-terminale déterminé par séquençage de la protéine est localisée après un peptide signal de 29 résidus.

Le clone λ HEC1922 a été utilisé comme sonde pour étudier l'expression du gène codant pour l'ECA par la méthode dite "Northern-blot" selon le procédé de Thomas et al (THOMAS, P.S. et al (1983) Methods in Enzymology, N.Y. Academic Press, 100, 255-266). Un ARN messager d'environ 4,3 kb de cellules endothéliales de veine ombilicale en culture s'hybride avec la sonde sus-mentionnée. Dans le testicule, seul un ARN messager, plus court, de 3 kb a été détecté. Dans les reins, qui

5 sont une source riche en ECA, aucune hybridation n'a été détectée dans les conditions utilisées en utilisant 20 µg d'ARN poly(A), ce qui laisse suggérer que la synthèse et les taux de turn-over de l'ECA sont faibles dans cet organe.

10 Une analyse par "Southern blot" de l'ADN humain dans des conditions stringentes a été réalisée avec un fragment EcoRI-BglIII de 300 paires de bases localisé à l'extrémité 5' du clone λHEC2111. L'ADN humain a été isolé à partir de noyaux de cellules du placenta, par traitement avec la protéinase K suivi d'extractions par le mélange phénol-chloroforme. L'ADN (14 µg) a été
15 digéré avec HindIII, séparé sur gel d'agarose à 0,7 % et analysé par hybridation selon la méthode "Southern Blot" (SOUTHERN, E.M. (1975) J. Mol. Biol, 98, 503-517).

20 Les fragments d'ADN ont été marqués selon la méthode décrite dans FEINBERG, A.P. et al (1983) anal. Biochem., 132, 6-13. Cette sonde s'hybride avec un fragment de restriction unique de 9,5 kb.

Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant un fragment d'ADNc proche de l'extrémité 3'.

25 Ce résultat confirme la présence d'un seul gène.

La détermination de l'activité enzymatique de l'ECA codée par le gène ainsi isolé, ou de tout polypeptide actif selon l'invention et issu de cette dernière, peut être déterminée notamment par la méthode
30 décrite par Holmquist et al (1979) précédemment cité.

Le dosage de cette ECA humaine peut être réalisé par des techniques radioimmunologiques (RIA) décrites par HIVADA K., et al (1987) Lung, 267, 27-35.

III POLYMORPHISMES DU GENE DE L'ECA

L'ADN de plusieurs individus a été isolés à partir des cellules nucléées par lyse des globules rouges suivies d'une lyse des globules blancs, d'un traitement
5 à la protéinase K et par extractions successives par le phénol et le chloroforme suivies d'une précipitation à l'isopropanol.

Une quantité déterminée d'ADN est ensuite digérée
10 par une enzyme de restriction et migrée sur un gel d'agarose qui sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. L'ADN est ensuite dénaturé par un traitement avec de la soude 0,5 N et transféré sur une membrane de nylon par buvardage pendant 12 heures.
15 L'ADN est ensuite fixé à la membrane par passage au four pendant 2 heures à 80°C.

La membrane est ensuite pré-hybridée avec une solution 4 x SSC, 10 x Denhardt pendant au moins 6 heures à 65°C. La membrane est ensuite hybridée avec
20 une solution tampon 4 x SSC, 1 x Denhardt, 25 mM NaPO₄, pH 7, 2 mM EDTA, 0,5 % SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué comprenant la sonde marquée dénaturée par la chaleur à 100°C pendant 3 minutes.

La sonde marquée est un mélange des fragments ADNC de l'ECA contenu dans les clones λ HEC1922 et λ HEC1922.
25

Les fragments d'ADN purifiés sont marqués à haute activité spécifique par la technique d'amorçage statistique utilisant le fragment de Klenow de la polymérase de E. coli et un déoxynucléotide marqué au
30 P³² à haute activité spécifique.

Les membranes sont hybridées en présence de la sonde pendant 12 heures à 65°C.

Après l'hybridation, la membrane est lavée dans une solution 2 x SSC, 1 x Denhardt, 0,5 % SDS à 65°C pendant 45 minutes à quatre reprises, lavée ensuite
35

dans une solution 0,2 x SSC, 0,1 x SSC pendant 45 minutes à 65°C à deux reprises, puis dans une solution 0,1 x SSC, 0,1 % SDS pendant 45 minutes à 65°C.

Les séquences ayant hybridé avec la sonde sont ensuite visualisées par autographie des membranes à -80°C en présence d'un écran intensificateur sur un film.

L'analyse de l'ADN de plusieurs individus avec les sondes ADNc de l'ECA ou des sondes équivalentes c'est-à-dire raccourcies à l'une des deux extrémités, ou allongées vers l'extrémité 3' ou 5' de la partie transcrite ou non transcrite du gène, ou des fragments d'ADN synthétiques qui gardent la propriété de s'hybrider avec les fragments de restriction sus-

- 5,8 kb ou 6 kb par digestion TaqI,
- 8,8 kb ou 9 kb par digestion DraI,
- 8,5 kb ou 9 kb par digestion DglII,
- 10,6 kb ou 11 kb par digestion KpnI,
- 8,4 kb ou 8,8 kb par digestion HindIII,
- 4,2 kb et 3,0 kb ou 4 kb et 2,7 kb par digestion BglI;
- 5,2 kb ou 5,7 kb par digestion RsaI, avec présence ou non d'une bande à 3,0 kb.
- 3,5 kb ou 3 kb par digestion XbaI,
- 4,3 kb ou 2,7 par digestion TaqI.

Par digestion par l'enzyme PvuII, on obtient deux profils ou pattern de restriction comportant la présence ou non d'une bande à 4,2 kb qui est associée à une bande plus faible de 2,2 et de 2,5 kb.

REVENDICATIONS

1. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il
5 comprend toute ou partie de la séquence nucléique de la
figure 3, et en ce qu'il code pour un polypeptide
capable d'hydrolyser l'angiotensine I et/ou les
kinines, notamment la bradykinine, ou tout acide
nucléique ne se distinguant du précédent au niveau de
10 sa séquence nucléotidique que par des substitutions de
nucléotides n'entraînant pas la modification de la
séquence en aminoacides du susdit polypeptide dans des
conditions propres à lui faire perdre les susdites
propriétés.

15 2. Acide nucléique selon la revendication 1,
caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN
délimitée par les nucléotides situés aux positions 110
et 3940 de la figure 3, codant pour l'ECA humaine
mature.

20 3. Acide nucléique selon la revendication 2,
caractérisé en ce que ladite séquence d'ADN codant pour
l'ECA humaine mature est précédée par une séquence
d'ADN délimitée par les nucléotides situés aux
positions 23 et 109 de la figure 3, cette dernière
25 codant pour un peptide signal de 29 acides aminés.

4. Acide nucléique selon la revendication 1,
caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN
s'étendant entre, d'une part, le nucléotide situé entre
les positions 1 à 1177 et, d'autre part, le nucléotide
30 situé entre les positions 3070 à 3940 de la figure 3.

5. Acide nucléique selon la revendication 1,
caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN
s'étendant entre, d'une part, le nucléotide situé entre
les positions 110 à 1177 et, d'autre part, le

nucléotide situé entre les positions 1276 à 1966 de la figure 3.

5 6. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN s'étendant entre, d'une part, le nucléotide situé entre les positions 1967 à 2971 et, d'autre part, le nucléotide situé entre les positions 3070 à 3940 de la figure 3.

10 7. Acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 associée avec un promoteur sous le contrôle duquel la transcription de la ladite séquence est susceptible d'être effectuée et, le cas échéant, une séquence d'ADN codant pour des signaux de terminaison de la transcription.

15 8. Vecteur recombinant, notamment plasmide recombinant, ou virus recombinant, capable de transformer, ou d'infecter, une cellule hôte appropriée, notamment une cellule eucaryote, ledit vecteur contenant un fragment d'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 sous le contrôle d'éléments de régulations permettant l'expression de ce fragment d'ADN dans la cellule hôte, notamment d'un promoteur reconnu par les polymérases de ladite cellule hôte.

25 9. Procédé de production de l'ECA humaine, mature ou non, ou d'un polypeptide issu de l'ECA humaine et capable d'hydrolyser l'angiotensine I et/ou les kinines, notamment la bradykinine, ce procédé comprenant la transformation de cellules hôtes au moyen du vecteur selon la revendication 8, la mise en culture des cellules hôtes transformées dans un milieu de

culture approprié et la récupération de l'enzyme à partir de ces cellules ou du milieu de culture.

5 10. Polypeptide codé par l'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend toute ou partie de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions -29 à 1277 de la figure 3, et en ce qu'il est capable d'hydrolyser
10 l'angiotensine I et/ou les kinines, notamment la bradykinine.

11. Polypeptide selon la revendication 10, caractérisé par la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 et 619 de la figure 3.
15

12. Polypeptide selon la revendication 10, caractérisé par la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 620 et 1229 de la figure 3.

20 13. Polypeptide selon la revendication 10, caractérisé par la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 350 et 395 de la figure 3.

25 14. Polypeptide selon la revendication 10, caractérisé par la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 948 et 993 de la figure 3.

30 15. Anticorps notamment monoclonal, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 10 à 14.

35 16. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est constituée par une séquence nucléotidique complémentaire de toute ou partie de l'acide nucléique de la revendication 1, ou toute sonde nucléotidique ne se distinguant de la précédente au niveau de séquence

nucléotidique que par des substitutions de nucléotides n'entraînant pas la modification des propriétés d'hybridation de ladite sonde avec l'acide nucléique de la revendication 1.

17. Procédé d'hybridation d'une sonde nucléotidique selon la revendication 16 avec un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend, dans les conditions d'hybridation stringentes, les étapes suivantes :

- traitement de préhybridation du support (filtre de nitrocellulose ou membrane de nylon), sur lequel est fixé l'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, à 65°C pendant 6 heures avec une solution ayant la composition suivante : 4 x SSC, 10 x Denhardt ;

- remplacement de la solution de pré-hybridation au contact du support par une solution tampon ayant la composition suivante : 4 x SSC, 1 x Denhardt, 25 mM NaPO_4 , pH 7, 2 mM EDTA, 0,5 % SDS, 100 µg/ml de sperme de saumon soniqué, comprenant la sonde nucléotidique, marquée notamment de manière radioactive, et préalablement dénaturée par un traitement à 100°C pendant 3 minutes ;

- incubation pendant 12 heures à 65°C ;

- lavages successifs avec les solutions suivantes

:

. 2 x SSC, 1 x Denhardt, 0,5 % de SDS pendant 45 minutes à 65°C à quatre reprises,

. 0,2 x SSC, 0,1 x SSC pendant 45 minutes à 65 °C à deux reprises,

. 0,1 x SSC, 0,1 % SDS pendant 45 minutes à 65°C.

18. Procédé d'hybridation d'une sonde nucléotidique selon la revendication 16 avec un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend, dans les conditions d'hybridation non stringentes, les étapes suivantes :

- traitement de préhybridation du support (filtre de nitrocellulose ou membrane de nylon), sur lequel est fixé l'acide nucléique, selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, à 40°C pendant 6 heures avec une solution ayant la composition suivante : 4 x SSC, 10 x Denhardt ;

- remplacement de la solution de pré-hybridation au contact du support par une solution tampon ayant la composition suivante : 4 x SSC, 1 x Denhardt, 25 mM NaPO₄, pH 7, 2 mM EDTA, 0,5 % SDS, 100 µg/ml de sperme de saumon soniqué, comprenant la sonde nucléotidique marquée notamment de manière radioactive, et préalablement dénaturée par un traitement à 100°C pendant 3 minutes ;

- incubation pendant 12 heures à 40°C,
- lavages successifs avec 2 x SSC à 45°C pendant 15 minutes à deux reprises.

19. Méthode de dépistage, ou de dosage, in vitro d'une ECA ou produit ayant in vivo les propriétés de l'ECA, dans un prélèvement biologique susceptible de le contenir, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'un anticorps selon la revendication 15, avec le susdit prélèvement biologique dans des conditions permettant la production éventuelle d'un complexe immunologique formé entre l'ECA ou produit qui en est dérivé et l'anticorps sus-mentionné ;

- la détection du susdit complexe immunologique

20. Méthode de dépistage, ou de dosage, in vitro
5 d'un acide nucléique selon l'une quelconque des
revendications 1 à 6, dans un prélèvement biologique
susceptible de le contenir, caractérisée en ce qu'elle
comprend :

10 - la mise en contact d'une sonde nucléotidique
selon la revendication 16, avec le susdit prélèvement
biologique dans des conditions permettant la production
éventuelle d'un complexe d'hybridation formé entre la
sonde et l'acide nucléique sus-mentionnés ;

- la détection du susdit complexe d'hybridation.

15 21. Méthode de dépistage in vitro selon
revendication 19 ou 20, appliquée au diagnostic in
vitro de pathologies telles que l'hypertension, de la
sarcoïdose et autres maladies granulomateuses, les
dysfonctionnements thyroïdiens.

20 22. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une
méthode de dépistage in vitro selon les revendications
19 et 21 comprenant :

25 - une quantité déterminée d'un anticorps selon la
revendication 15 susceptible de donner lieu à une
réaction immunologique avec un polypeptide à détecter
selon l'une quelconque des revendications 10 à 14 ;

- avantageusement, un milieu approprié à la
formation d'une réaction immunologique entre le po-
lypeptide et l' anticorps sus-mentionnés ;

30 - avantageusement, des réactifs permettant la
détection des complexes immunologiques formés entre le
polypeptide et l' anticorps lors de la susdite réaction
immunologique.

23. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une
méthode de dépistage in vitro selon la revendication
20 et 21 comprenant :

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique
selon la revendication 16, susceptible de donner lieu à
une réaction d'hybridation avec un acide nucléique
selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ;
- avantageusement, un milieu approprié à la
formation d'une réaction d'hybridation entre l'acide
nucléique et la sonde sus-mentionnée ;
- avantageusement, des réactifs permettant la
détection des complexes d'hybridation formés entre
l'acide nucléique et la sonde lors de la susdite
réaction d'hybridation.

24. Méthode de détection ou de dosage, d'un
inhibiteur de l'ECA, ou de quantification de son
pouvoir inhibiteur, qui comprend la mise en contact
d'un polypeptide selon l'une quelconque des
revendications 10 à 14 avec ledit inhibiteur, et la
détermination du coefficient d'inhibition de l'enzyme
par l'inhibiteur, notamment par mesure de l'éventuelle
activité enzymatique résiduelle sur un substrat
approprié de l'ECA.

25. Compositions pour le traitement de maladies
inflammatoires ou infectieuses, notamment de la
pancréatite aigue, et des maladies où les kinines
jouent un rôle pathogène, caractérisées par
l'association d'un polypeptide selon l'une quelconque
des revendications 10 à 14, avec un véhicule
pharmaceutiquement acceptable.

26. Méthode de dépistage in vitro des
polymorphismes du gène codant pour l'ECA au sein d'une
population donnée d'individus, réalisé à partir un

échantillon biologique tel que le sang prélevé dans ladite population caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 - le traitement de l'acide nucléique issu de l'échantillon biologique sus-mentionné réalisé à l'aide d'une enzyme de restriction dans des conditions permettant l'obtention de fragments de restriction issu du clivage dudit acide nucléique au niveau de ces sites de
- 10 restrictions reconnus par ladite enzyme,
 - la mise en contact d'une sonde nucléotidique selon la revendication 16, susceptible de s'hybrider avec les fragments sus-mentionnés dans des conditions permettant la production éventuelle de complexes
 - 15 d'hybridation entre ladite sonde et les fragments de restriction sus-mentionnés,
 - la détection des susdits complexes d'hybridation,
 - la mesure de taille des éventuels fragments de
 - 20 restriction polymorphes engagés dans les complexes d'hybridation sus-mentionnés.

1/13

| | | | |
|-------|------|---|-----------|
| CN1 | 5.6 | L K Q G W T P R R | 882-890 |
| CN2 | 9.7 | G H I Q Y F | 962-967 |
| CN3 | 10.9 | P P E F W E G S | 310-317 |
| CN4 | 12.1 | A L E K I A F L P F G Y L V D Q - R - G V F | 429-450 |
| CN5 | 12.3 | V V P F P D K P N L D V T S T - L Q | 268-285 |
| CN6 | 12.8 | E T T Y S V A T V | 719-727 |
| CN7 | 13.0 | K L G F S R P W P E A | 1143-1153 |
| CN8a | 14.0 | L E (K) P T D G R E V V - H A | 917-930 |
| CN8b | - | W A (Q) S W E N I Y D | 257-266 |
| CN9 | 19.3 | A T S R K Y E D L L | 746-755 |
| CN10 | 20.6 | V G L D A L D A Q | 560-568 |
| CN11a | 22.2 | L L F A W E G W H N A A G I P L K P L | 156-174 |
| CN11b | - | Y E T P S L - Q D L E R L | 800-812 |

TABLEAU 1

2/13

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|
| HUMAIN | | L | D | P | G | L | Q | P | G | (D) | F | S | A | D | E | A | G |
| LAPIN | T | L | D | P | G | L | L | P | G | D | F | A | A | D | N | A | G |
| BOEUF | E | L | D | P | A | L | Q | P | G | N | F | P | A | D | E | A | G |
| PORC | | L | D | S | A | L | Q | P | G | C | F | T | A | D | E | A | G |
| SOURIS | | L | D | P | G | L | Q | P | G | N | F | S | P | D | E | A | G |

Figure 1

3/13

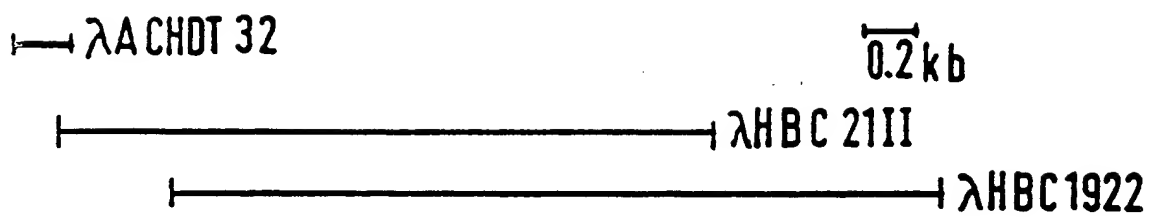


FIG. 2

4/13

G C C G A G C A C C G C G C A C C G C G T C 22

ATG G G G C C C T C G G G C C C G G G G C C G G G C T G C T G C C G C T G C T G C T G C T G C C G
Met Gly Ala Ala Ser Gly Arg Gly Pro Gly Leu Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu Pro
-29 -20 -10

C C G C A G C C C C C T G G A C C C G G G C T G C A G C C C G G C A A C T T T T C T G C T G A C G A G C C G G G 157
Pro Gln Pro Ala Leu Ala Leu Asp Pro Gly Leu Gln Pro Gly Asn Phe Ser Ala Asp Glu Ala Gly

+1 10

G C G C A G C T C T T C G G C G C A G C T A C A A C T C C A G C G C C G A A C A G G T G C T G T C C A G A G C G T G G C C G C C A G C
Ala Gln Leu Phe Ala Gln Ser Tyr Asn Ser Ser Ala Glu Gln Val Leu Phe Gln Ser Val Ala Ala Ser

20 30

T G G G C G C A C G A C A C C A A C A T C A C C G G G A G A T G C A A G C G C C A G G A G G A A G C A G C C C T G C T C A G C 292
Trp Ala His Asp Thr Asn Ile Thr Ala Glu Asn Ala Arg Arg Gln Glu Glu Ala Ala Leu Leu Ser

40 50 60

C A G G A G T T T G C G G A G C C T G G G C C A G A G G C C A A G A G C T G T A T G A A C C G A T C T G G C A G A A C T T C A C G
Gln Glu Phe Ala Glu Ala Trp Gly Gln Lys Ala Lys Glu Leu Tyr Glu Pro Ile Trp Gln Asn Phe Thr

70 80

G A C C C G C A G C T G C G C A G G A T C A T C G G A G C T G T G C G A A C C C T G G G C T C T G C C A A C C T G C C C C T G G C T 427
Asp Pro Gln Leu Arg Arg Ile Ile Gly Ala Val Arg Thr Leu Gly Ser Ala Asn Leu Pro Leu Ala

90 100

A A G C G G C A G C A G T A C A A C G C C C T G C T A A G C A A C A T G A G C A G G A T C T A C T C C A C C G C C A A G G T C T G C C T C
Lys Arg Gln Gln Tyr Asn Ala Leu Leu Ser Asn Met Ser Arg Ile Tyr Ser Thr Ala Lys Val Cys Leu

110 120

FIG.3A

5/13

CCCAACAAAGACTGCCACCTGCTGGTCCCTGGACCCAGATCTACCAACATCTGCGCTTCCTCGCGA 562
 Pro Asn Lys Thr Ala Thr Cys Trp Ser Leu Asp Pro Asp Leu Thr Asn Ile Leu Ala Ser Ser Arg 130
 AGCTACGCCCATGCTCCTGCTTGGCTGGGAGGGCTGGGCACAAACGCTGGCGGCATCCCGCTGAAACCGCTG 150
 Ser Tyr Ala Met Leu Leu Phe Ala Trp Glu Gly Trp His Asn Ala Ala Gly Ile Pro Leu Lys Pro Leu 160
 TACGAGGATTTCACTGCCCTCAGCAATGAAGCCTACAAAGCAGGACGGCTTCACACACACGGGGCC 170
 Tyr Glu Asp Phe Thr Ala Leu Ser Asn Glu Ala Tyr Lys Glu Asp Gly Phe Thr Asp Thr Gly Ala 180
 TACTGGCGCTCCCTGCTACAACTCCCCACCTTCGAGGACGATCTGGAAACCTCTACCAACAGCTAGAG 190
 Tyr Trp Arg Ser Trp Tyr Asn Ser Pro Thr Phe Glu Asp Asp Leu Glu His Leu Tyr Glu Gln Leu Glu 200
 CCCCTCTACCTGAACCTCCATGCTTCGTCGCGCCGCACTGCAATCGCCGATACGGAGACAGATAC 210
 Pro Leu Tyr Leu Asn Leu His Ala Phe Val Arg Arg Ala Leu His Arg Arg Tyr Gly Asp Arg Tyr 220
 ATCAACCTCAGGGACCCATCCCTGCTCATCTGCTGGGAGACATGCTGGGCCCGAGAGCTGGGAAACATC 230
 Ile Asn Leu Arg Gly Pro Ile Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Ala Gln Ser Trp Gly Asn Ile 240
 TACGACATGGTGGTCCCTTTCCAGACAAAGCCCAACCTCGATGTCACCACTACTAGCTGACGAG 250
 Tyr Asp Met Val Val Pro Phe Pro Asn Lys Pro Asn Leu Asp Val Thr Ser Thr Met Leu Gln 260
 270

FIG.3B

6/13

GGCTGGAAACGCCACATGTTCCGGGTGGCAGAGGAGTCTTTCACCTCCCTGGAGCTCTCCCCCAIG
GlyTrpAsnAlaThrHisMetPheArgValAlaGluGluPheThrSerLeuGluLeuSerProMet
290
CCTCCCGAGTTCTGGGAAGGTCGATGCTGGAGAAGCCGGCCGACGGGGCGGAGTGGTGGCCAC1102
ProProGluPheTrpGluGlySerMetLeuGluLysProAlaAspGlyArgGluValValCysHis
310 320 330
GCCTCGGCTTGGGACTTCTACAACAGGAAAGACTTCAGGATCAAGCAGTGCACACGGGTCAAGATGGAC
AlaSerAlaTrpAspPheTyrAsnArgLysAspPheArgIleLysGlnCysThrArgValThrMetAsp
340 350
CAGCTCTCCACAGTGCACCATGAGATGGGCCATATACAGTACTACCTGCAGTACAAGGATCTGCCCC1237
GlnLeuSerThrValHisHisGluMetGlyHisIleGlnTyrTyrLeuGlnTyrLysAspLeuPro
360 370
GTCTCCC16CGTCGGGGGCCAACCCCGCTTCCATGAGGCCATTGGGGACGTGCTGGCGCTCTCGGCTC
ValSerLeuArgArgGlyAlaAsnProGlyPheHisGluAlaIleGlyAspValLeuAlaLeuSerVal
380 390
TCCACTCTGAAACATCTGCACAAAATCGGCCCTGCTGGACCCTGTGCACCAATGACACGGAAAGT6AC1372
SerThrProGluHisLeuHisLysIleGlyLeuLeuAspArgValThrAsnAspThrGluSerAsp
400 410 420
ATCAATTACTTGCTAAAAATGGCACTGGAAAAAATTGCCCTTCTGCCCCCTTGGCTACTTGGTGGACCAAG
IleAsnTyrLeuLeuLysMetAlaLeuGluLysIleAlaPheLeuProPheGlyTyrLeuValAspGln
430 440

FIG.3C

7/13

TGGCGCTGGGGGCTTTAGTGGGCGTACCCCTTCCCGCTACAACCTCGACTGGTGATCTT 1507
 TrpArgTrpGlyValPheSerGlyArgThrProProSerArgTyrAsnPheAspTrpTrpTyrLeu
 450
 CGAACCAAGTATCAGGGGATCTGTCCTCTGTTACCCGAAACGAAACCCACTTTGATGCTGGAGGCTAAG
 ArgThrLysTyrGlnGlyIleCysProProValThrArgAsnGluThrHisPheAspAlaGlyAlaLys
 470
 TTTCAATGTTCCAAATGTGACACATACATCAGGTACTTTGTGAGTTTGTCTGCAGTTCAGTTTC 1642
 PheHisValProAsnValThrProTyrIleArgTyrPheValSerPheValLeuGlnPheGlnPhe
 490
 CATGAAAGCCCTGTGCAAGGAGGAGGCTATGAGGGCCCACTGCACCAAGTGTGACATCTACCGGTCCACC
 HisGluAlaLeuCysLysGluAlaGlyTyrGluGlyProLeuHisGlnCysAspIleTyrArgSerThr
 510
 AAAGCAAGGGCCCAAGCTCCGGAAAGGTGCTGCAAGGCTGGCTCCCTCCCAAGGCCCTGGCAGGAGGCTG 1777
 LysAlaGlyAlaLysLeuArgLysValLeuGlnAlaGlySerSerArgProTrpGlnGluValLeu
 530
 AAGCACTGGTCGGCTTAGATGCCCTGGATGCCCAAGCCGCTGCTCAAGTACTCCAGCCAGTCCACCCAG
 LysAspMetValGlyLeuAspAlaLeuAspAlaGlnProLeuLeuLysTyrPheGlnProValThrGln
 550
 TGGCTGTAGGAGCAGAACCAAGCAGAACGGCGAGGCTCCTGGGCTGGCCGAGTACCAGTGGCACCCG 1912
 TrpLeuGlnGluGlnAsnGlnGlnAsnGlyGluValLeuGlyTrpProGluTyrGlnTrpHisPro
 570
 580
 590
 600

FIG.30

8/13

CCCTT6CCCT6ACAACCTACCCGGAGGGGCATAGACCTGGTGACTGATGAGGCTGAGGCCAGCAAGTTTGTG
 ProLeuProAspAsnTyrProGluGly⁶¹⁰IleAspLeuValThrAspGluAlaGluAlaSerLysPheVal
 620
 GAGGAATATGACCCGGACATCCCA66TGGTGGTGGAAACGAGTATGCCGAGGCCAACTGGAACTACAAC 2047
 GluGluTyrAspArgThrSerGlnValValTrpAsnGluTyrAlaGluAlaAsnTrpAsnTyrAsn
 630
 ACCAACATCACACAGAGACCGCAAGATTCTGCTGCGAGAAGAACTGCAATAGCCCAACCAACCCCTG
 ThrAsnIleThrThrGluThrSerLysIleLeuLeuGlnLysAsnMetGlnIleAlaAsnHisThrLeu
 640
 AAGTAC86CA~~CCCAGGCCAGGAAGTTT~~GATGTGAACCACTGCGAGAACCACTATCAAGCGGATC 2102
 LysTyrGlyThrGlnAlaArgLysPheAspValAsnGlnLeuGlnAsnThrThrIleLysArgIle
 650
 ATAAAGAG66TTCAGGACCTAGAACGGGCGAGCGCTGCTGCCCGAGGAGCTGGAGGAGTACAAACAAGATC
 IleLysLysValGlnAspLeuGluArgAlaAlaLeuProAlaGlnGluLeuGluGluTyrAsnLysIle
 660
 CTGTTGGGATATGGAAACCACTACAGCGCTGGCCACTGTGTGTGCCACCCGAATGGCAGCTGCCCTGCGAG 2317
 LeuLeuAspMetGluThrThrTyrSerValAlaThrValCysHisProAsnGlySerCysLeuGln
 670
 CTC8AG6CCAGATCTGACGGAATGTGATGGCCACATCCCGGAATATGAAGACC TGTTATGGGCGCATGGGAG
 LeuGluProAspLeuThrAsnValMetAlaThrSerArgLysTyrGluAspLeuLeuTrpAlaTrpGlu
 680
 690
 700
 710
 720
 730
 740
 750

FIG.3E

9/13

66CTGGC6AGACAAGGCGGGGAGAGCCATCCTCCAGTTTACCCGAAATACGTGGAACTCATCAAC 2452
 GlyTrpArgAspLysAlaGlyArgAlaIleLeuGlnPheTyrProLysTyrValGluLeuIleAsn 760 770
 CA6GCTGCCCGCTCAATGGCTATGTAGATGCAGGGGACTCGTGGAGGTCIATGTACGAGACACCATCC
 GlnAlaAlaArgLeuAsnGlyTyrValAspAlaGlyAspSerTrpArgSerMetTyrGluThrProSer 780 800
 CTGGAGCAAGACCTGGAGCGGCTCTTCCAGGAGCTGCAGCCACTCTACCTCAACCTGCCATGCCCTAC 2587
 LeuGluGlnAspLeuGluArgLeuPheGlnGluLeuGlnProLeuTyrLeuAsnLeuHisAlaTyr 810 820
 GTGCCCGCGCCCTGCCACCGTCACCTACGGGGGCCAGCAATCAACCTGGAGGGGCCCATTCCTGCTCAC
 ValArgArgAlaLeuHisArgHisTyrGlyAlaGlnHisIleAsnLeuGluGlyProIleProAlaHis 830 840
 CTGCTGGGAAACATGTGGGCGCAGACCTGGTCCAAACATCTATGACTTGGTGGTGGCCCTTCCCTTCA 2722
 LeuLeuGlyAsnMetTrpAlaGlnThrTrpSerAsnIleTyrAspLeuValValProPheProSer 850 860 870
 GCGCCCTCGATGGACACCACAGAGGCTATGCTAAAGCAGGGGCTGGACGCCCCAGGAGGATGTTTAA66AG
 AlaProSerMetAspThrThrGluAlaMetLeuLysGlnGlyTrpThrProArgArgMetPheLysGlu 880 890
 GCTGATGATTTCTTCACCTCCCTGGGGGCTGCTGCCCGCTGCTGAGTCTGGGAACAAGTGGATG 2857
 AlaAspAspPhePheThrSerLeuGlyLeuLeuProValProProGluPheTrpAsnLysSerMet 900 910

FIG.3F

10/13

CTGGAGAAAGCCAAACCGACGGGGGGGAGGTGGTCTGCCACGGCCTGGGACTTCTACAACGGCAAG
 Leu Glu Lys Pro Thr Asp Gly Arg Glu Val Val Cys His Ala Ser Ala Trp Asp Phe Tyr Asn Gly Lys
 920 930
 GACTTCCGGGAICAAAGCAGTGCACCACCGTGAACTTGGAGGACCTGGTGGTGGCCACCAAGAAATG 2997
 Asp Phe Arg Ile Lys Gln Cys Thr Thr Val Asn Leu Glu Asp Leu Val Val Ala His His Glu Met
 940 950 960
 GGCCACATCCAGTATTTTCATGCAGTACAAAGACTTACCTGTGGCCTTGAGGGAGGGGTGCCAACCCTGGC
 Gly His Ile Gln Tyr Phe Met Gln Tyr Lys Asp Leu Pro Val Ala Leu Arg Glu Gly Ala Asn Pro Gly
 970 980
 TTCCATGAGGCCCAITGGGGACGTGCTAGCCCTCTCAGTGTCIACGCCCAAGCACCTGACACAGTCTC 3127
 Phe His Glu Ala Ile Gly Asp Val Leu Ala Leu Ser Val Ser Thr Pro Lys His Leu His Ser Leu
 990 1000
 AACCTGCTGAGCAGTGAGGGTGCGCAAGCAGGCAATGACATCAACTTCTGATGAAGATGGCCCTTGAC
 Asn Leu Leu Ser Ser Glu Gly Gly Ser Asp Glu His Asp Ile Asn Phe Leu Met Lys Met Ala Leu Asp
 1010 1020
 AAGATCGCCCTTATCCCTTCAGCTACCTCGTCGATCAGTGGCGCTGGAGGGTATTGATGGGAAGC 3262
 Lys Ile Ala Phe Ile Pro Phe Ser Tyr Leu Val Asp Gln Trp Arg Trp Arg Val Phe Asp Gly Ser
 1030 1040 1050
 ATCACCAGGAGAACTATAACCAAGAGTGGTGGAGCTGCTCAAGGCTGAAGTACCAAGGCTCTCTGCCCCCA
 Ile Thr Lys Glu Asn Tyr Asn Gln Gln Trp Trp Ser Leu Arg Leu Lys Tyr Gln Gly Leu Cys Pro Pro
 1060 1070

FIG.36

11/13

6T6CCCA6GACTCAAGGTGACTTTGACCCAGGGCCAAAGTCCACATTCCTTCTAGCGTGCCCTTAC 3397
 ValProArgThrGlnGlyAspPheAspProGlyAlaLysPheHisIleProSerSerValProTyr 1080 1090
 ATCA66TACTTTGTGAGCTTTCATCAGTTCAGTTCACGAGGCACTGTGCGCAGGCAAGCTGGCCAC
 IleArgTyrPheValSerPheIleIleGlnPheGlnPheHisGluAlaLeuCysGlnAlaAlaGlyHis 1100 1110
 AC66GCCCCCTGCGACAAGTGTGACATCTACAGTCCAGGAGGCCCGGGCAGCGCTGGCCAGCCGCC 3532
 ThrGlyProLeuHisLysCysAspIleTyrGlnSerLysGluAlaGlyGlnArgLeuAlaThrAla 1120 1130 1140
 ATGAA6CTG6GCTTCAGTAGGCCGTG6GCCGGAAGCCATGCCAGCTGATCACGGGCCAGCCCCAACATGAGC
 MetLysLeuGlyPheSerArgProTrpProGluAlaMetGlnLeuIleThrGlyGlnProAsnMetSer 1150 1160
 GCCTC66CCATGTGAGCTIACCTTCAAGCCGCTGCTGGACTGGCTCCGCAAGGAGAACGAGCTGCAI 3667
 AlaSerAlaMetLeuSerTyrPheLysProLeuLeuAspTrpLeuArgThrGluAsnGluLeuHis 1170 1180
 666GAGAA6CTG6GCTG6CCGAGTACAACCTGGACGCCGAACTCCGCTCGCTCAGAA6GGCCCCCTCCCA
 GlyGluLysLeuGlyTrpProGlnTyrAsnTrpThrProAsnSerAlaArgSerGluGlyProLeuPro 1190 1200
 GACA6CG6CCGCTCAGCTTCCTG6GCTG6ACCTGGATGCCGACGACGCCCGCTGGCCAGTGG 3802
 AspSerGlyArgValSerPheLeuGlyLeuAspLeuAspAlaGlnGlnAlaArgValGlyGlnTrp 1210 1230
 1210

FIG.3H

12/13

CTGCTGCTCTTCCCTGGGCAATCGCCCTGCTGGTAGCCACCCCTGGGCCCTCAGCCAGCGGCTCTTCAGCATC
LeuLeuLeuPheLeuGlyIleAlaLeuLeuValAlaThrLeuGlyLeu SerGlnArgLeuPheSerIle
 1240 1250

CGCCACCGCAGCCCTCCACCGGCACATCCACGGGCCCCAGTTCCGGCTCCGAGGTGGAGCTGAGACAC 3937
 ArgHisArgSerLeuHisArgHisSerHisGlyProGlnPheGlySerGluValGluLeuArgHis
 1260 1270

TCCCTGAGGTGACCCGGCTGGGTCCGGCCCTGCCCAAGGGCCCTCCACCCAGAGACTGGGATGGGAACACTG
 Ser ★
 1277

GTGGGCAAGCTGAGGCGGT 4024

FIG.3I

13/13

| | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---------|---|---|---|-----|
| ECAR | T | V | H | H | E | M | G | H | 365 | E | A | I | 391 |
| ECAR | V | A | H | H | E | M | G | H | 963 | E | A | I | 989 |
| THERM | V | V | A | H | E | L | T | H | 146 | E | A | I | 168 |
| INEP | V | I | G | H | E | I | T | H | 581/588 | | | | |
| hCOLL | V | I | G | H | E | L | G | H | 222 | | | | |
| | H | L | H | K | - | I | - | G | 409 | | | | |
| | H | L | H | S | - | L | - | N | 1007 | | | | |
| THERM | H | L | N | S | G | I | I | N | 238 | | | | |
| INEP | H | L | N | - | G | I | - | N | 635/643 | | | | |
| hCOLL | H | L | R | Y | R | I | E | N | 120 | | | | |

FIGURE 4



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|---|-----------|---|
| <p>(51) Classification internationale des brevets⁵ : C12N 15/57, C12P 21/02 C07K 7/10, C12N 9/48 C12Q 1/68, G01N 33/68 C12Q 1/37, A61K 37/02 C12P 21/08</p> | <p>A3</p> | <p>(11) Numéro de publication internationale: WO 90/03435</p> <p>(43) Date de publication internationale: 5 avril 1990 (05.04.90)</p> |
| <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR89/00496</p> <p>(22) Date de dépôt international: 27 septembre 1989 (27.09.89)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 88/12620 27 septembre 1988 (27.09.88) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SOUBRIER, Florent [FR/FR]; 11, square Henry-Paté, F-75016 Paris (FR). ALHENC-GELAS, François [FR/FR]; 23, rue Rosenwald, F-75015 Paris (FR). HUBERT, Christine [FR/FR]; Parc Effel 32, Rue des Bruyères, F-92310 Sèvres (FR). CORVOL, Pierre [FR/FR]; 88, rue de Sèvres, F-75007 Paris (FR).</p> | | <p>(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc. ; S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud, 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</p> <p>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 31 mai 1990 (31.05.90)</p> |
| <p>(54) Title: NUCLEIC ACID CODING FOR THE HUMAN ANGIOTENSIN CONVERSION ENZYME (ACE), AND ITS APPLICATIONS PARTICULARLY FOR THE <i>IN VITRO</i> DIAGNOSIS OF HIGH BLOOD PRESSURE</p> <p>(54) Titre: ACIDE NUCLEIQUE CODANT POUR L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE (ECA) HUMAINE, ET SES APPLICATIONS, NOTAMMENT POUR LE DIAGNOSTIC <i>IN VITRO</i> DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to the cloning and sequencing of nucleic acid coding for human ACE as well as to the determination of the peptidic chain corresponding to ACE and active peptidic fragments derived therefrom. The invention also relates to the utilization of the above-mentioned polypeptides for implementing methods for <i>in vitro</i> diagnosis of high blood pressure, for the conceptual study of new inhibitors of ACE. The invention also relates to the use of nucleotidic probes of the invention for the <i>in vitro</i> detection of polymorphisms of the gene coding for ACE.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne le clonage et le séquençage de l'acide nucléique codant pour l'ECA humaine ainsi que le détermination de la chaîne peptidique correspondant à l'ECA et de fragments peptidiques actifs qui en découlent. L'invention a également pour objet l'utilisation des polypeptides sus-mentionnés pour la mise en œuvre de méthodes de diagnostic <i>in vitro</i> de l'hypertension, pour l'étude conceptuelle de nouveaux inhibiteurs de l'ECA. L'invention concerne également l'utilisation des sondes nucléotidiques de l'invention pour le dépistage <i>in vitro</i> des polymorphismes du gène codant pour l'ECA.</p> | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|-----------------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche | ES | Espagne | MG | Madagascar |
| AU | Australie | FI | Finlande | ML | Mali |
| BB | Barbade | FR | France | MR | Mauritanie |
| BE | Belgique | GA | Gabon | MW | Malawi |
| BF | Burkina Faso | GB | Royaume-Uni | NL | Pays-Bas |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BJ | Bénin | IT | Italie | RO | Roumanie |
| BR | Brazil | JP | Japon | SD | Soudan |
| CA | Canada | KP | République populaire démocratique de Corée | SE | Suède |
| CF | République Centrafricaine | KR | République de Corée | SN | Sénégal |
| CG | Congo | LI | Liechtenstein | SU | Union soviétique |
| CH | Suisse | LK | Sri Lanka | TD | Tchad |
| CM | Cameroun | LU | Luxembourg | TG | Togo |
| DE | Allemagne, République Fédérale d' | MC | Monaco | US | Etats-Unis d'Amérique |
| DK | Danemark | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

International Application No

PCT/FR89/00496

| | | |
|---|--|-------------------------------------|
| I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁵ C12N 15/57, C12P 21/02, C07K 7/10, C12N 9/48 C12Q 1/68, G01N 33/68, C12Q 1/37, A61K 37/02 C12P 21/08 | | |
| II. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum Documentation Searched ⁷ | | |
| Classification System | Classification Symbols | |
| Int.Cl. ⁵ | C12N, G01N, C12Q | |
| Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸ | | |
| | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ | | |
| Category ⁹ | Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² | Relevant to Claim No. ¹³ |
| Y | The Journal of Biological Chemistry, vol. 263, no. 23, 15 August 1988, (US), K.E. Bernstein et al.: "The isolation of angiotensin- converting enzyme cDNA", pages 11021-11024, see the whole article (cite in the application) | 1-26 |
| X | The Journal of Biological Chemistry, vol. 260, no. 5, 10 March 1985, The American Soc. of Biological Chemists, Inc. (US), H. G. Bull et al.: "Purification of angiotensin- converting enzyme form rabbit lung and human plasma by affinity chromatography", pages 2963-2972, see the whole article | 10 |
| Y | (cited in the application) | 11-14 |
| X | Federation Proceedings (US) vol.45, No. 6, 1986, T. Kreofsky et al.: "Purification of human lung angiotensin converting enzyme (ACE) and production of anti-catalytic monoclonal antibodies MoAb", see abstract | 10,15 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"A" document member of the same patent family</p> </div> </div> | | |
| IV. CERTIFICATION | | |
| Date of the Actual Completion of the International Search | Date of Mailing of this International Search Report | |
| 22 January 1990 (22.01.90) | 18 April 1990 (18.04.90) | |
| International Searching Authority | Signature of Authorized Officer | |
| European Patent Office | | |

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

-2-

| Category * | Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to Claim No |
|------------|--|----------------------|
| Y | no. 556 | 11-14, 19-26 |
| X | ----- Biological Abstracts/RMM, accession no. 36018036, R.K. A. Allen et al.: "Monoclonal antibodies to human pulmonary angiotensin-converting enzyme", & Australian and New Zealand Journal of Medicine (Australia) 1988, vol. 18, no.3, suppl.2, p547, see the abstract | 15 |
| Y | | 19-26 |
| X | Chemical Abstracts, vol. 106, 1987, (Columbus, Ohio, US) see page 470, abstract no. 16946f & JP, A, 61186399 (FUJI PHARMACEUTICAL INDUSTRIES CO.; LTD) 20 August 1986 | 15 |
| Y | | 19-26 |
| X | ----- Chemical Abstracts, vol. 108, 1988, (Columbus, Ohio, US) S.M. Danilov et al.: "Monoclonal antibody to human lung angiotensin-converting enzyme", see page 266, abstract no. 18303j & Biotechnol. App. Bioche. 1987, 9(4), 319-22 | 15 |
| Y | | 19-26 |
| Y | ----- Chemical Abstracts, vol. 104, 1986, (Columbus, Ohio, US) H. Hiroshi et al.: "Pharmacological comparison of captopril and MK-422 by a new method for measuring activity of angiotension converting enzyme (ACE)" see page 7, abstract no. 179632Y & Jpn. Circ. J. 1985, 49(11), 1175-9 | 24 |
| Y | ----- Chemical Abstracts, vol. 107, 1987, (Columbus, Ohio, US) C. Deluca-Flaherty et al.: "Hybridization and partial cDNA sequence analyses of bovine lung angiotensin I-converting enzyme", see page 169, abstract no. 148356u & Int. J. Pept. Protein Res. 1987, 26(6) 678-84 (cited in the application) | 1-26 |
| | ----- | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 89/00496

| | | |
|---|--|---------------------------------|
| I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) * | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB : C 12 N 15/57, G 01 N 33/02; C 07 K 7/10; C 12 N 9/48 C 12 P 21/08 | | |
| II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ | | |
| Documentation minimale consultée * | | |
| Système de classification | Symboles de classification | |
| CIB ⁵ | C 12 N, G 01 N, C 12 Q | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté * | | |
| | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ** | | |
| Catégorie * | Identification des documents cités, ** avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ** | N° des revendications visées ** |
| Y | The Journal of Biological Chemistry, vol. 263, no. 23, 15 août 1988, (US) K.E. Bernstein et al.: "The isolation of angiotensin-converting enzyme cDNA", pages 11021-11024, voir l'article en entier (cité dans la demande) | 1-26 |
| X | The Journal of Biological Chemistry, vol. 260, no. 5, 10 mars 1985, The American Soc. of Biological Chemists, Inc. (US) H.G. Bull et al.: "Purification of angiotensin-converting enzyme from rabbit lung and human plasma by affinity chromatography", pages 2963-2972, voir l'article en entier | 10 |
| Y | (cité dans la demande) | 11-14 |
| -- | | |
| * Catégories spéciales de documents cités: ** « A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent « E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date « L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) « O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens « P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée « T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou le thème constituant la base de l'invention « X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive « Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. « & » document qui fait partie de la même famille de brevets | | |
| IV. CERTIFICATION | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 22 janvier 1990 | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 18. 04. 90 | |
| Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS | Signature du fonctionnaire autorisé <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">M. PEIS</div> M. Peis | |

| III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS | | (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE) |
|--|---|---|
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents | N° des revendications visées |
| X | Federation Proceedings (US), vol. 45, no. 6, 1986 T. Kreofsky et al.: "Purification of human lung angiotensin converting enzyme (ACE) and production of anti-catalytic monoclonal antibodies MoAb" voir résumé no. 556 | 10,15 |
| Y | -- | 11-14,19-26 |
| X | Biological Abstracts/RMM, accession no. 36018036 R.K.A. Allen et al.: "Monoclonal antibodies to human pulmonary angiotensin-converting enzyme", & Australian and New Zealand Journal of Medicine(Australia) 1988, vol. 18, no. 3, suppl. 2, p547 voir résumé | 15 |
| Y | -- | 19-26 |
| X | Chemical Abstracts, vol. 106, 1987, (Columbus, Ohio, US) voir page 470, résumé no. 16946f & JP, A, 61186399 (FUJI PHARMACEUTICAL INDUSTRIES CO., LTD) 20 août 1986 | 15 |
| Y | -- | 19-26 |
| X | Chemical Abstracts, vol. 108, 1988, (Columbus, Ohio, US) S.M. Danilov et al.: "Monoclonal antibody to human lung angiotensin-converting enzyme" voir page 266, résumé no. 18303j & Biotechnol. Appl. Biochem. 1987, 9(4), 319-22 | 15 |
| Y | -- | 19-26 |
| Y | Chemical Abstracts, vol. 104, 1986, (Columbus, Ohio, US) H. Hiroshi et al.: "Pharmacological comparison of captopril and MK-422 by a new method for measuring activity of angiotension converting enzyme (ACE)", voir page 7, résumé no. 179632y & Jpn. Circ. J. 1985, 49(11), 1175-9 | 24 |
| | -- | |

| III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS | | (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE) |
|--|---|---|
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents | N° des revendications visées |
| Y | <p>Chemical Abstracts, vol. 107, 1987, (Columbus, Ohio, US) C. Deluca- -Flaherty et al.: "Hybridization and partial cDNA sequence analyses of bovine lung angiotensin I-converting enzyme", voir page 169, résumé no. 148356u & Int. J. Pept. Protein Res. 1987, 26(6), 678-84 (cité dans la demande)</p> <p>-----</p> | 1-26 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)